

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

Williane Miranda de Sena Reis

**DIETA CETOGÊNICA DURANTE A LACTAÇÃO: avaliação do
crescimento, perfil bioquímico e microbiota intestinal na prole de
ratos jovens**

Recife-PE

2022

WILLIANE MIRANDA DE SENA REIS

**DIETA CETOGÊNICA DURANTE A LACTAÇÃO: avaliação do crescimento,
perfil bioquímico e microbiota intestinal na prole de ratos jovens**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Nutrição da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para obtenção
de bacharel em Nutrição.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Giselia de Santana Muniz.

Recife

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Reis, Williane Miranda de Sena.

Dieta cetogênica durante a lactação: avaliação do crescimento, perfil bioquímico e microbiota intestinal na prole de ratos jovens / Williane Miranda de Sena Reis. - Recife, 2022.

50 : il., tab.

Orientador(a): Giselia de Santana Muniz

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Nutrição - Bacharelado, 2022.

Inclui referências, anexos.

1. Dieta Cetogênica. 2. Microbiota intestinal. 3. Hiperlipidemia. 4. Gordura abdominal. I. Muniz, Giselia de Santana. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

WILLIANE MIRANDA DE SENA REIS

**DIETA CETOGÊNICA DURANTE A LACTAÇÃO: avaliação do crescimento,
perfil bioquímico e microbiota intestinal na prole de ratos jovens**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Nutrição da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para obtenção
de bacharel em Nutrição.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Aprovada em: 26/10/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Giselia de Santana Muniz
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Diogo Antônio Alves de Vasconcelos
Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

Durante o período da lactação, alterações na dieta materna, como por exemplo aumento do teor de gordura podem atuar como estímulo ambiental e assim modificar o rumo do desenvolvimento dos sistemas do organismo. A dieta cetogênica é uma alternativa dietética e que pode apresentar relações com o crescimento somático, composição corporal, perfil lipídico e microbiota intestinal. O objetivo geral é avaliar os efeitos que uma dieta cetogênica, rica em gordura saturada, durante a lactação tem sobre o crescimento somático, bioquímica e a microbiota intestinal na prole de ratos jovens. Foram utilizadas 11 ratas *Wistar*, nulíparas, adultas e 48 filhotes machos provenientes dessas ratas. Após o nascimento dos filhotes, as ratas eram direcionadas para um dos grupos experimentais: o Grupo Controle (GC; n=6) com a dieta controle (3,6cal/g, 18% proteínas, 63% carboidratos e 19% de lipídios) e Grupo Cetogênico (GK; n=5) com a dieta cetogênica (5,4cal/g; 19% proteínas, 10% carboidratos e 71% de lipídios). Cada grupo contou com um número de 24 filhotes, divididos de acordo com a dieta ofertada à mãe durante a lactação, tendo o Filhote do Grupo Controle (FGC) e o Filhote do Grupo Cetogênico (FGK). Após o desmame, as proles de ambos os grupos receberam a dieta controle até os 60 dias de vida. A prole de ambos os grupos foi avaliada aos 25º e 60º dia de vida, assim foi feita a análise do peso corporal, as medidas murinométricas, o consumo alimentar, o perfil bioquímico, peso de órgãos (fígado, gordura visceral e retroperitoneal), e a análise quantitativa da microbiota intestinal fecal. Foram utilizados teste “T” de Student’s, o teste ANOVA *two-way* por medidas repetidas e o teste “T” de Student’s Pared. O nível de significância foi $p < 0,05$. Assim, o FGK quando comparado ao FGC apresentou um maior peso corporal ao 25º dia de vida, enquanto que aos 60º dia apresentou uma menor peso corporal. E em ambas avaliações, o FGK obteve uma maior quantidade de gordura abdominal, bem como maiores concentrações de glicose, colesterol total, triglicerídeos, VLDL-col e LDL-col. Também foram observadas alterações na microbiota fecal do FGK. O consumo de uma dieta cetogênica materna rica em gordura saturada, durante a lactação resultou em disbiose intestinal na prole, estando também associado a hipercolesterolemia e hiperglicemia, causando um maior depósito de gordura abdominal. Entretanto, não foram observadas alterações no crescimento somático dos animais. Os resultados destacam a importância que a adequação nutricional tem para manter um equilíbrio dos parâmetros corporais e metabólicos, assim como para a saúde da microbiota intestinal.

Palavras-chave: Dieta cetogênica. Hiperlipidemia. Gordura abdominal. Microbiota intestinal.

ABSTRACT

During the lactation period, changes in the maternal diet, such as an increase in fat content, can act as an environmental stimulus and thus change the course of development of the body's systems. The ketogenic diet is a dietary alternative that may be related to somatic growth, body composition, lipid profile and intestinal microbiota. The general objective is to evaluate the effects that a ketogenic diet, rich in saturated fat, during lactation has on somatic growth, biochemistry and intestinal microbiota in the offspring of young rats. Eleven nulliparous, adult Wistar rats and 48 male offspring from these rats were used. After the birth of the pups, the rats were directed to one of the experimental groups: the Control Group (CG; n=6) with the control diet (3.6cal/g, 18% protein, 63% carbohydrates and 19% lipids) and Ketogenic Group (GK; n=5) with the ketogenic diet (5.4cal/g; 19% proteins, 10% carbohydrates and 71% lipids). Each group had a number of 24 pups, divided according to the diet offered to the mother during lactation, having the pup from the Control Group (FGC) and the pup from the Ketogenic Group (FGK). After weaning, the offspring of both groups received the control diet until 60 days of age. The offspring of both groups were evaluated at the 25th and 60th day of life, thus analyzing body weight, murinometric measurements, food consumption, biochemical profile, organ weight (liver, visceral and retroperitoneal fat), and quantitative analysis of the fecal intestinal microbiota. The Student's "T" test, the two-way ANOVA test for repeated measures and the Student's Pared "T" test were used. The significance level was $p < 0.05$. Thus, the FGK when compared to the FGC presented a higher body weight at the 25th day of life, while at the 60th day it presented a lower body weight. And in both evaluations, the FGK obtained a greater amount of abdominal fat, as well as higher concentrations of glucose, total cholesterol, triglycerides, VLDL-chol and LDL-chol. Changes in the fecal microbiota of FGK were also observed. The consumption of a maternal ketogenic diet rich in saturated fat during lactation resulted in intestinal dysbiosis in the offspring, being also associated with hypercholesterolemia and hyperglyceridemia, causing a greater deposition of abdominal fat. However, no changes were observed in the animals' somatic growth. The results highlight the importance of nutritional adequacy for maintaining a balance of body and metabolic parameters, as well as for the health of the intestinal microbiota.

Keywords: Ketogenic diet. Hyperlipidemia. Abdominal fat. Gut microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho da divisão dos grupos experimentais expostos às dietas controle e cetogênica.	27
Figura 2 - Detalhamento dos grupos experimentais expostos às dietas controle e cetogênica durante a lactação e no pós-desmame.	29
Figura 3 - Peso corporal dos filhotes e o percentual de ganho de peso durante a lactação e no pós-desmame.	32
Figura 4 - Medidas murinométricas analisadas no período da lactação.	33
Figura 5 - Efeito da ingestão de dieta cetogênica nas mães e repercussão na microbiota intestinal da prole durante o período da lactação e no pós-desmame.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de macronutrientes, segundo o valor energético total (VET) das dietas AIN-93G, Cetogênica e Presence.	27
Tabela 2 - Distribuição de nutrientes da dieta cetogênica desenvolvida a partir da AIN-93G.	28
Tabela 3 - Peso dos órgãos da prole aos 25 e 60 dias de vida que foram submetidos a dieta cetogênica durante a lactação.	33
Tabela 4 - Perfil bioquímico da prole aos 25 e 60 dias de vida que foram submetidos a dieta cetogênica durante a lactação.	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Os períodos críticos do desenvolvimento	16
2.2	Dietas hiperlipídicas na gestação e lactação	18
2.3	Dieta cetogênica	19
2.4	Composição nutricional das dietas e a microbiota intestinal	21
3	HIPÓTESE	24
4	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivo geral	25
4.2	Objetivos específicos	25
5	METODOLOGIA	26
5.1	Quanto aos animais	26
5.2	Manipulação dietética e grupos experimentais	27
5.3	Procedimentos	29
5.3.1	<u>Peso corporal da prole durante a lactação e após o desmame</u>	29
5.3.2	<u>Medidas murinométricas da prole durante a lactação</u>	29
5.3.3	<u>Eutanásia e testes post mortem</u>	30
5.3.4	<u>Coleta e homogeneização do sangue e dos tecidos</u>	30
5.3.5	<u>Análise dos parâmetros bioquímicos</u>	30
5.3.6	<u>Análise da microbiota intestinal</u>	30
5.4	Análise estatística	31
6	RESULTADOS	32

7	DISCUSSÃO	37
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXO A - Parecer nº 111/2019 CEUA - UFPE	50

1 INTRODUÇÃO

O período crítico do desenvolvimento é caracterizado como janelas fisiológicas, como durante a gestação, lactação e primeira infância, onde os tecidos e os órgãos estão susceptíveis a danos (MORGANE et al., 1993; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). Assim, quando o ser vivo recebe nesta fase uma agressão ambiental este organismos pode se adaptar pelo instinto de sobrevivência, e ser afetado metabolicamente de forma irreversível (PAPALIA; OLDS; FELDMAN, 2006; LEITÃO; NEVES, 2017).

Estas adaptações estão relacionadas às alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, permitindo à persistência a vida da população e das espécies. A seleção genética e a plasticidade fenotípica podem explicar estes mecanismos. A seleção genética corresponde ao aumento da frequência de alelos favoráveis ao longo das gerações à medida que os desfavoráveis tendem a diminuir (GRENIER; BARRE; LITRICO, 2016). Já a plasticidade no período crítico permite que o organismo modifique sua trajetória de crescimento e desenvolvimento através de processos adaptativos, podendo ser alterado sua forma, estado, movimento ou padrão de atividade (WEST-EBERHARD, 1989). Sendo assim, a plasticidade durante o período crítico permite que os organismos possam ter seus processos de desenvolvimento modificados a depender do estímulo ambiente ao qual for exposto (BRADSHAW, 1965).

As alterações nos padrões dietéticos são consideradas uma forma de estímulo ambiental, aos quais os organismos são expostos e que podem desencadear modificações no crescimento e no desenvolvimento (MOST; TOSTI; REDMAN; FONTANA, 2017). O período da gestação e/ou lactação correspondem a uma fase crítica importante para os indivíduos, e alterações tanto restritivas quanto excessivas em calorias e nutrientes podem gerar modificações no desenvolvimento dos organismos até a vida adulta (KILLEEN et al., 2022).

A dieta materna rica em lipídios tem sido associada às doenças de caráter metabólico e comportamental na prole quando adulta (KANG; KURTI; FAIR; FRYER, 2014). Alguns estudos com a utilização das dietas hiperlipídicas durante o período perinatal estão associando a prole quando adulta a maiores prevalências de obesidade e riscos associados (BONEY; VERMA; TUCKER; VOHR, 2005),

resistência à insulina, aumento da leptina plasmática (SAMUELSSON et al., 2008; KIRK et al., 2009), alterações no desenvolvimento de sistemas, como o cardíaco (ESPÍRITO-SANTO et al., 2022).

A dieta cetogênica (DC) está classificada nos modelos de dietas hiperlipídicas, mas também como dieta com baixíssimo teor de carboidratos. Assim, a dieta cetogênica é categorizada como composições nutricionais com baixo teor de carboidratos (aproximadamente 10%), alto teor de lipídios (cerca de 60 a 80%), e adequada em proteína em relação ao valor calórico. Os baixos percentuais de carboidratos não são suficientes para as demandas metabólicas e isso faz com que o organismo faça uma troca na sua fonte primária de energia, cargo antes ocupado pela glicose, e agora passando a ser desempenhada pela gordura (VEECH, 2004; PEREIRA et al., 2010; AMORIM; PADILHA; ACCIOLY, 2013).

Essa diminuição da disponibilidade adequada de glicose como fonte de energia, faz com que o fígado converta a gordura em ácidos graxos e produza corpos cetônicos (cetonas), substituindo a glicose como fonte de energia primária. O aumento das cetonas é conhecido como cetose nutricional. Embora a resposta individual seja variável, a cetose geralmente é desencadeada pela restrição da ingestão de carboidratos a menos de 50 gramas por dia com algum grau de restrição proteica, evitando a neoglicogênese das proteínas. A utilização da gordura como fonte de energia, a partir dos corpos cetônicos formados não permite que a neoglicogênese hepática a partir das proteínas seja ativada, evitando assim a diminuição da massa magra (MORENO-SEPÚLVEDA; CAPPONI, 2020).

Durante a ingestão crônica de alta quantidade de lipídios e baixa quantidade de carboidratos, o metabolismo sofre alterações semelhantes ao que ocorre em jejum, como o aumento da lipólise, gliconeogênese e síntese de corpos cetônicos a partir de lipídios para consumo energético (VIZUETA, 2012). Por conta dessas alterações metabólicas, a DC também é relatada para perda de peso corporal em humanos (MCKENZIE et al., 2017), visto que a produção de corpos cetônicos produzidos e utilizados durante o consumo da DC são oriundos da gordura corporal, promovendo um balanço energético negativo e otimizando a perda de peso (MORENO-SEPÚLVEDA; CAPPONI, 2020).

A primeira descrição do uso da DC foi na década de 1920, sendo utilizada como tratamento alternativo para crianças que possuíam epilepsia de difícil controle como as epilepsias refratárias, e que não apresentavam algum tipo de reação aos medicamentos utilizados na época (WILDER, 1921 apud INUZUKA-NAKAHARADA, 2008). E devido às novas tecnologias para o tratamento de tais condições, a dieta cetogênica como uma forma de tratamento foi perdendo espaço, mas na atualidade segue sendo tema de estudos que buscam compreender melhor a associação que existe entre esses dois fatores (RAMOS, 2001; RAIMANN et al., 2007; MARTIN; JACKSON; LEVY; COOPER, 2016). Precisa-se de mais estudos para que os efeitos do uso da DC possam ser estabelecidos, mas sabe-se que os principais efeitos colaterais apresentados estão relacionados com o período de instalação do hábito da utilização da dieta (ARMENO et al., 2014).

Atualmente a literatura vem discutindo sobre a interação entre a nutrição e alimentação sobre o desenvolvimento e equilíbrio da microbiota intestinal. E que os protocolos dietéticos ricos em lipídios podem influenciar na microbiota intestinal (HE et al., 2018). Assim, a alimentação durante a gestação e/ou lactação das ratas parece influenciar esta microbiota intestinal (FRESE; MILLS, 2015; MEROPOL; EDWARDS, 2015).

Sabe-se que o trato gastrointestinal dos humanos é colonizado por bilhões de microrganismos representados por diversos tipos de bactérias. Não existindo uma composição ideal e/ou específica para a microbiota intestinal, pois existe uma variação de indivíduo para indivíduo, que sofre de interferências quanto às transições infantis, uso de antibióticos, hábitos de vida, dieta, cultura e individualidade de cada um (RINNINELLA et al., 2019).

A composição da microbiota intestinal inicia antes e durante o parto, possui uma íntima relação com a microbiota materna, e segue evoluindo durante as outras fases da vida. Fatores como parto cesáreo, uso de antibióticos de forma exacerbada durante a infância e padrões alimentares desequilibrados são grandes influenciadores da colonização e equilíbrio da microbiota intestinal. Entretanto, o aleitamento materno é considerado um alimento completo para os recém-nascidos, sabe-se que este leite pode promover a colonização de bactérias e fungos que compõem a diversidade de microbiota, e esta microbiota intestinal pode ser formada

de acordo com a “memória intestinal” da mãe - Isto explica o contato que ocorre com a microbiota intestinal da mãe por via enteromamária (HONEYMAN; RIOS; DIEZ, 2016; PAIXÃO; CASTRO, 2016).

Em estudo realizado com crianças, avaliando a eficácia da dieta cetogênica por 6 meses no tratamento da epilepsia refratária, foi observado que este modelo dietético promoveu mudanças na composição da microbiota intestinal, alterando a riqueza e diversidade das espécies existentes. Neste estudo foi evidenciado aumento na quantidade de *Bacteroides*, e uma redução da quantidade de *Firmicutes* e *Actinobacteria* (ZHANG et al, 2018). Resultados similares foram observados em estudos experimentais realizados com ratos, onde os mesmos associaram a utilização da dieta cetogênica com alteração na diversidade dos microrganismos da microbiota intestinal destes animais (PAOLI et al., 2019).

Alguns estudos associaram a disbiose da microbiota intestinal com alguns danos à saúde dos indivíduos como doença inflamatória intestinal (BIEN; PALAGANI; BOZKO, 2013; WEN; DUFFY, 2017), resistência à insulina (WEN; DUFFY, 2017), doenças alérgicas (VERNOCCHI; DEL CHIERICO; PUTIGNANI, 2016) e autoimunes (CHU et al., 2017), assim como as doenças crônicas não transmissíveis, como a diabetes e obesidade.

Póvoa (2002) evidencia que existe um desequilíbrio intestinal associado a obesidade, explicado pelo ganho excessivo de peso corporal, ao desequilíbrio dietético e principalmente pelo alto consumo de açúcares simples, está correlacionado com o aumento da permeabilidade intestinal destes indivíduos obesos, desencadeando uma microbiota intestinal pobre em microorganismos. Assim, há uma íntima relação entre a obesidade e a microbiota intestinal gerando alterações em suas composições microbiológicas devido ao quadro de obesidade dos indivíduos (ZHAO, 2013).

Ainda não estão estabelecidos mecanismos e as consequências que uma dieta cetogênica durante a lactação pode trazer a microbiota intestinal e o crescimento e desenvolvimento dos lactentes. O que se conhece é o fato de que uma redução dos carboidratos da dieta será acompanhada também por uma redução significativa na quantidade de fibras dietéticas consumidas. E as fibras desempenham um papel bastante importante no trato gastrointestinal, como: na

manutenção da função de barreira do tecido, na manutenção da integridade da mucosa e ajuda na diminuição da inflamação, assim como contribuem para uma melhora no trânsito intestinal e na saciedade, e todos esses fatores quando modificados possuem interferências diretas ou indiretas na saúde dos indivíduos, relatadas anteriormente. A partir de um estudo experimental, busca-se avaliar e estabelecer relações entre o uso de uma dieta pobre em carboidratos e rica em gordura saturada durante a lactação - dieta cetogênica - sobre o crescimento somático, o perfil bioquímico e a microbiota intestinal de ratos jovens.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O período crítico do desenvolvimento

O período crítico do desenvolvimento é caracterizado por ser um período de tempo em que determinados processos são afetados de forma irreversível e que estão relacionados com a aquisição de aspectos relacionados com a biologia dos seres vivos, ou seja, englobam mudanças no nível de crescimento, maturação e desenvolvimento (PAPALIA; OLDS; FELDMAN, 2006; LEITÃO; NEVES, 2017). Este termo é utilizado de várias perspectivas, visto que todos os sistemas apresentam suas especificidades quanto aos seus períodos críticos de desenvolvimento, sendo utilizado pela embriologia, neurobiologia e até mesmo por um viés etológico. Sendo esses períodos críticos correspondentes principalmente ao período pré-natal e a primeira infância (MORGANE et al., 1993; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

Este período crítico permite que os mamíferos possam passar por variações com o tempo em resposta a diferentes condições ambientais, ou seja, é caracterizado como a capacidade de organismos geneticamente idênticos responderem a estímulos ambientais de maneiras distintas (BRADSHAW, 1965; SCHEINER, 1993; NOVOPLANSKY, 2002). Sendo um sistema de grande relevância para a garantia da sobrevivência (BARKER; BAIER, 2013).

De acordo com estes conceitos sobre os períodos críticos surgiu a hipótese da plasticidade fenotípica. Segundo Bradshaw (1965), a plasticidade fenotípica foi entendida como respostas de organismos a diferentes condições ambientais ou estímulos, em outras palavras, seria a capacidade de um genótipo de manifestar diferentes fenótipos em resposta a um estímulo ambiental. Desta forma, o genótipo não gera fenótipos específicos, pois as mudanças são diferentes de acordo com o tipo de interações dos genes com as cadeias bioquímicas, celulares e teciduais.

A plasticidade fenotípica deve considerar diferentes níveis hierárquicos: o celular, o fisiológico e o de desenvolvimento, existindo uma continuidade de respostas entre esses níveis. Assim, sinais no nível celular podem resultar em mudanças de níveis fisiológicos e de desenvolvimento; normalmente as respostas de nível celular e fisiológico podem ser revertidas em escalas de tempo curto,

enquanto que a de desenvolvimento tende a ser irreversível ou leva mais tempo para ter algum tipo de reversão (SCHLICHTING; SMITH, 2002).

O tipo específico e o nível de plasticidade é algo que possui uma individualidade, ou seja, uma certa característica de um organismo passa a ser flexível como resposta a mudanças de temperatura, mas pode também ser estável em relação à variação de nutrientes ou vice-versa. Tendo isso como base, pode-se afirmar que existe uma vasta variação genética para as respostas de plasticidade em populações naturais, tornando possível a evolução da plasticidade por seleção natural e outros mecanismos (WEST-EBERHARD, 2003).

Temos que a plasticidade é expressa por traços que apresentam ligações diretas ao desenvolvimento, sob seleção natural, determinadas por condições ambientais (SULTAN; BAZZAZ, 1993). Mas é preciso entender que nem toda a variação fenotípica em resposta a condições ambientais é resultado da seleção natural. Por vezes, as características de plasticidade ocorrem devido a restrições inevitáveis impostas pelos níveis hierárquicos já citados (WEST-EBERHARD, 2003).

A nutrição é um dos fatores ambientais que pode desencadear respostas adaptativas em várias espécies. O padrão dietético desequilibrado mostra-se como um estímulo capaz de gerar mudanças no desenvolvimento dos organismos como uma resposta às condições ambientais (MOST et al., 2017). Uma das pesquisas sobre o tema relaciona-se o consumo alimentar da população de Okinawa antes da década de 1960 com as mudanças em seus hábitos alimentares devido ao aumento das redes de “*fast food*” nesta região. Antes a alimentação destes indivíduos era rica em vegetais frescos, frutas, batata-doce, soja e peixe. Após a introdução de alimentação tipo “*fast food*” houve um aumento no índice de massa corporal e também da taxa de mortalidade (MOST et al., 2017).

Há relatos na literatura sobre os impactos ocorridos nos primeiros 1000 dias de vida, período este que compreende desde a concepção até os 24 meses de idade em humanos, que podem alterar fisiometabolicamente a fase adulta dos indivíduos. Por exemplo, descobriu-se que o baixo peso ao nascer e/ou desnutrição aos dois anos de idade apresenta associação com uma menor estatura nos adultos (ALDERMAN et al., 2017). E estudo evidencia a associação da dieta hiperlipídica materna com repercussões para a prole até a vida adulta, como alterações no

comportamento alimentar e na composição corporal (CHAVES et al., 2021), assim como pode alterar os níveis de colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos, VLDL e glicemia, o que por sua vez pode atuar como contribuição para o desenvolvimento de doenças metabólicas no futuro (OLIVEIRA et al., 2011).

2.2 Dietas hiperlipídicas na gestação e lactação

Durante a gestação ocorrem inúmeras mudanças em todos os sistemas do corpo materno, o que possibilita o desenvolvimento e a proteção fetal, preparo para o parto e lactação, e compensação das novas demandas tanto materna quanto fetal (TAN; TAN, 2013; SOMA-PILLAY et al., 2016; KOHLHEPP et al., 2018).

As alterações restritivas ou excessivas podem afetar os sistemas e gerar adaptações em mamíferos. Killeen (2022) relaciona a nutrição com relação mãe e feto. Este autor ainda descreve que os excessos e restrições durante a gestação aumentam o risco de doenças crônicas não transmissíveis no feto. Assim, o consumo excessivo de carboidratos pode gerar uma hiperglicemia materna que por sua vez aumenta o acesso do feto a glicose, aumentando também seu crescimento fetal; e traçando um caminho mais longo esse aumento no crescimento fetal pode aumentar a predisposição à obesidade e aos seus riscos associados.

Investigação também mostra associação entre uma dieta materna rica em gordura e os impactos na vida adulta, como exemplificado em pesquisas experimentais com ratos, as dietas obesogênicas consumidas pela genitoras promovem uma prole obesa e com maiores predisposição a desenvolverem hipertensão arterial; além disso estes ratos apresentam fenótipo com resistência à insulina e aumento da leptina plasmática (SAMUELSSON et al., 2008; KIRK et al., 2009). Segundo Boney et al. (2005), ao desenvolverem pesquisa com seres humanos observaram que crianças aos 11 anos de idade que foram expostas à obesidade materna durante a gestação apresentam alto fator de risco para desenvolverem síndrome metabólica. Além desses, é possível citar associação com alteração no desenvolvimento cardíaco da prole, gerando uma hipertrofia desse órgão (ESPÍRITO-SANTO et al., 2022).

2.3 Dieta cetogênica

A dieta cetogênica é classificada como dieta hiperlipídica. Entretanto, a dieta cetogênica apresenta percentuais mais elevados em lipídios. Assim, geralmente, caracteriza-se como dieta cetogênica as que possuem 60 a 80% de lipídios, percentuais adequados de proteínas (15 a 20%) e baixo teor de carboidratos (até 10%) (VEECH, 2004; PEREIRA et al., 2010; AMORIM; PADILHA; ACCIOLY, 2013).

De acordo com os achados na literatura, existem diversos protocolos para a composição da dieta cetogênica. Assim temos: 1) Dieta Cetogênica Clássica: caracterizada por ter cerca de 90% das calorias totais diárias advindas das gorduras e os 10% restantes é resultado de um somatório de carboidratos e proteínas, mas o percentual de carboidratos não deve ultrapassar 5% das calorias totais diárias. 2) Dieta cetogênica com triglicéridos de cadeia média (MCT): a maior parte das gorduras ofertadas são de cadeia média, sendo estas mais cetogênicas do que as de cadeia longa. Assim é possível que haja a oferta de uma proporção maior de carboidratos e proteínas, diferente da proporção 4:1 da dieta clássica que a torna de difícil adesão, e essa mudança na proporção dos macronutrientes não afeta a evolução da cetose fisiológica. 3) Dieta Atkins modificada (DAM): relação de 1:1 de LIP: não LIP, tendo uma maior proporção de proteínas na dieta, o que vai melhorar a palatabilidade e adesão à dieta. Mesmo com essa proporção, a ideia é manter a restrição de carboidratos em até 5%. A característica de uma maior quantidade de proteínas na dieta pode interferir no processo de cetose, visto que muitos aminoácidos são gliconeogênicos e podem ser utilizados na produção endógena de glicose. 4) Dieta Cetogênica de baixo índice glicêmico (Dbaixo IG): esse tipo de dieta mantém a maior oferta de proteína e pouco carboidrato encontrado na DAM, sendo a diferença na oferta obrigatória de carboidratos de absorção lenta e gradativa, tendo baixos índices glicêmicos e baixa carga glicêmica (SCHOELER; CROSS, 2016; GINER et al., 2017).

Mesmo com essas diferentes definições, todos os estudos concordam que uma dieta cetogênica apresenta uma restrição de carboidratos, apresentando menos de 50 gramas de carboidratos por dia (ou 5 a 10% do total da ingestão calórica diária) e gordura até 90% do Valor Energético Total (VET) (PAOLI; RUBINI et al., 2013). Outros autores defendem que a composição deve ter menos de 50g de

carboidratos por dia, independente da gordura, da proteína ou da ingestão calórica (WESTMAN et al., 2003 apud WILSON; LOWERY, 2017). Outros achados literários descrevem que a dieta cetogênica deve ser composta por: 1) Quatro vezes mais gordura do que carboidratos, com a proteína adequada para que 90% das calorias sejam providas pela gordura (SWINK et al., 1977 apud WILSON; LOWERY, 2017). 2) Menos de 50g de carboidratos por dia ou 10% do total de calorias diárias de carboidratos, ou seja seriam 200g de carboidratos numa dieta de 2000kcal/dia (ACCURSO et al., 2008 apud WILSON; LOWERY, 2017). 3) Alto teor de gordura, baixo teor de carboidratos e proteínas (FREEMAN, 1998 apud WILSON; LOWERY, 2017). 4) Uma dieta livre mas que consiste em um consumo inferior a 50g de carboidratos por dia (GREGORY et al., 2017 apud WILSON; LOWERY, 2017).

Essas mudanças nas proporções dos macronutrientes da dieta irão gerar alterações metabólicas como diminuição da glicose e cetose fisiológica. Isto ocorre devido a uma estimulação dos efeitos metabólicos do jejum, o que força o corpo humano a fazer uma alteração quanto o substrato energético utilizado, da glicose para a gordura, na forma dos corpos cetônicos (VEECH, 2004; PEREIRA et al., 2010; AMORIM; PADILHA; ACCIOLY, 2013).

Após consumo da dieta cetogênica a gordura torna-se o nutriente mais abundante, fazendo com que o organismo retire dela a energia para manter os processos vitais. A gordura entra na circulação sob a forma de ácidos graxos (AGs) que irão seguir até o fígado onde serão clivados pela β - oxidação formando o acetil-CoA, que pode ser utilizado e assim oxidado pelo ciclo de Krebs ou pode formar os corpos cetônicos. Esse estado cetogênico pode ser interrompido com a ingestão de carboidratos, devido a instalação de novas reservas de glicose (MORENO-SEPÚLVEDA; CAPPONI, 2020).

Além de suas indicações, principalmente, em casos de doenças neurológicas, na literatura também é possível encontrar associações com outras disfunções, como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, acne, câncer, síndrome de ovários policísticos (PAOLI; RUBINI et al., 2013). Além de sua relação como tratamento da obesidade, apesar das controvérsias do seu uso para a perda de peso, é bastante popular (PAOLI; BIANCO et al., 2013). As evidências científicas

do uso da dieta cetogênica sobre as dietas convencionais ainda não são totalmente conclusivas.

Apesar dos achados benéficos do uso da dieta cetogênica (PAOLI et al., 2019), não se pode negar a necessidade de novos estudos que demonstrem os efeitos negativos para o seu uso. Tem-se o conhecimento sobre algumas alterações em decorrência da utilização da dieta cetogênica, como: as complicações digestivas, que incluem vômitos, diarreia, obstipação; hipoglicemia; hipercetonemia; acidose metabólica; hiperlipidemia e até casos de nefrolitíase, diminuição de massa óssea, deficiência de micronutrientes, doença cardíaca e atraso do crescimento (GINER et al., 2017).

Diante dessas alterações metabólicas, surgem os estudos que fazem uma associação entre o padrão alimentar adotado, que no caso do presente estudo seria a dieta cetogênica, e a saúde da microbiota intestinal (ZHANG et al., 2018; PAOLI et al., 2019). Assim como, a influência da alimentação durante a gestação e/ou lactação das ratas sobre as repercussões na sua prole (FREESE; MILLS, 2015).

2.4 Composição nutricional das dietas e a microbiota intestinal

A microbiota intestinal é caracterizada por ser um conjunto de microrganismos, incluindo bactérias, vírus e fungos que povoam o trato gastrointestinal humano e que em condições normais, não causam doenças ou disfunções, assegurando uma boa qualidade de vida do hospedeiro. Os principais filos microbianos são: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*, sendo as mais predominantes (cerca de 90% da microbiota intestinal) os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (RINNINELLA et al., 2019).

O nascimento e o tipo de parto são um dos responsáveis sobre o início da composição da microbiota intestinal dos descendentes. E acredita-se que a microbiota materna influencia diretamente no tipo de microrganismos que irão colonizar a flora intestinal dos filhos. Então a própria composição do microbioma materno pode ser um fator e está atrelado aos hábitos alimentares materno, assim como a duração da gestação e a via do parto, principalmente o normal, onde vai ser possível um contato direto do recém-nascido com microbiota fecal da mãe. Sendo posteriormente, seguido pelo contato com o ambiente, a amamentação ou uso de

fórmulas, e até mesmo a exposição à antibióticos (PAIXÃO; CASTRO, 2016; CHONG; BLOOMFIELD; O'SULLIVAN, 2018).

Quando esta microbiota intestinal é formada sob condições favoráveis de crescimento e desenvolvimento é composta por microrganismos que fornecem vantagens à saúde do hospedeiro. Dentre estes benefícios é possível observar permeabilidade intestinal adequada, proteção contra invasores patogênicos e um bom funcionamento do sistema imunológico (ZHANG et al., 2015). Outros fatores também podem influenciar a saúde da microbiota intestinal do hospedeiro, que vai desde as transições infantis, hábitos de vida, cultura até o seu padrão dietético (RINNINELLA et al., 2019).

Quanto à relação com a dieta, sabe-se que ela é um dos principais moduladores da composição da microbiota intestinal. E os nutrientes possuem uma interação com microbiota intestinal, os carboidratos que são as principais fontes de fibras dietéticas, que quando fermentáveis produzem os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) que exercem papéis bem importantes como: manutenção da função de barreira do tecido, regulação da expressão gênica e imunorregulação, homeostase colônica, estimulação da proliferação e diferenciação das células epiteliais, a absorção de sais e água, a manutenção da integridade da mucosa e diminuição da inflamação. Além disso, atua como inibidores da histona desacetilase, desempenhando um papel crucial na regulação epigenética e atuando como agentes anticâncer; e aumentando o tempo de trânsito e saciedade (RINNINELLA et al., 2019).

A quantidade e a qualidade de gordura da dieta também mostram-se como um fator de grande importância como contribuinte para a disbiose intestinal. A dieta é composta por ácidos graxos, que são divididos entre os saturados (SFAs), os monoinsaturados (MUFAs) e os poliinsaturados (PUFAs); estudos mostram que o consumo de dietas ricas em gordura (HFD), em específico os SFAs, descrevem uma diminuição das *Bacteroidetes* e *Bacillus bifidus*, e um aumento das *Firmicutes* e *Proteobacteria*. Esta composição de microrganismos caracteriza-se como uma alteração da composição da microbiota intestinal, e assim um desequilíbrio da mesma. Além disso, as dietas ricas em lipídios estão associadas com uma estimulação da produção de bactérias redutoras de sulfato (SRB), o que leva a

defeitos na camada de muco e a um aumento da inflamação intestinal (RINNINELLA et al., 2019).

Assim, o presente projeto, busca aprofundar o entendimento acerca da associação desse tipo de dieta rica em lipídios com baixos percentuais de carboidratos na lactação com o crescimento, parâmetros bioquímicos e a composição da microbiota intestinal, por meio da análise da microbiota intestinal fecal dos animais.

3 HIPÓTESE

A dieta cetogênica foi muito utilizada e comentada, principalmente por ter mecanismos anticonvulsivantes, sendo assim, torna-se uma opção para controlar ou prevenir convulsões ou no tratamento de diferentes tipos de crises epiléticas. Atualmente vem sendo muito utilizada no esporte e por indivíduos que buscam uma rápida perda de peso. Assim, indivíduos que fazem uso desse tipo de estratégia, têm uma dieta rica em lipídios com maior proporção de ácido graxo saturado, com a substituição de uma grande parcela do percentual de carboidrato, e quanto às recomendações para as proteínas encontra-se dentro do percentual descrito.

Os carboidratos, as principais fontes de fibra alimentar da nossa alimentação, e esses elementos possuindo um papel de grande importância quando se fala da saúde da microbiota intestinal e funcionamento do trato gastrointestinal dos indivíduos, o quanto uma dieta pobre em carboidratos e com um grande acréscimo de gordura saturada interferiria na microbiota intestinal dos indivíduos que a utilizam, como também afetaria a promoção de um maior crescimento corporal, as possíveis alterações no perfil bioquímico e na quantidade de gordura corporal. Sendo assim, é esperado que os modelos animais, que apresentam uma fisiologia bem semelhante à fisiologia humana, possam ajudar na identificação dessas alterações frente a mudança de uma alimentação padrão para uma dieta cetogênica rica em gordura saturada.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos que uma dieta cetogênica, rica em gordura saturada, durante a lactação tem sobre o crescimento somático, bioquímica e a microbiota intestinal na prole de ratos ao desmame e quando jovens.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar o crescimento somático e peso dos órgãos;
- Analisar a microbiota intestinal fecal;
- Quantificar os parâmetros bioquímicos sanguíneos.

5 METODOLOGIA

5.1 Quanto aos animais

Foram utilizadas 11 ratas *Wistar* nulíparas da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), todos os animais são mantidos em gaiolas de polipropileno (46cmx34cmx20cm) coberta com maravalha esteril, em um ambiente de ciclo invertido de luz (20hr às 8hr) e escuridão (8hr às 20hr), numa temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e com acesso livre tanto a ração quanto a água. O projeto seguiu as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, assim como as normas estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, sendo submetido à Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA). O projeto foi aprovado sob nº 111/2019 pela CEUA da UFPE (Anexo A).

Os neonatos foram obtidos a partir do acasalamento entre animais machos e as fêmeas nulíparas (proporção 1:2), não são consanguíneos, com idade entre 90 e 120 dias. A possível fertilização foi avaliada através do teste de esfregaço vaginal com a visualização do espermatozóide, e de acordo com a evolução ponderal das fêmeas. Quando a gestação era confirmada, as fêmeas foram separadas dos machos e colocadas em gaiolas individuais, onde tiveram livre acesso à água e a ração comercial Presence (Purina do Brasil).

Após o nascimento da prole, as ninhadas foram compostas por 8 filhotes na proporção de machos:fêmeas de 4:4 ou 5:3; sendo divididas em grupos de acordo com a dieta administrada *ad libitum* para as ratas durante o período da lactação (Figura 1). Desta forma seguiu-se até o desmame, que aconteceu aos 25 dias de nascidos, sendo o experimento finalizado aos 60 dias de vida dos filhotes.

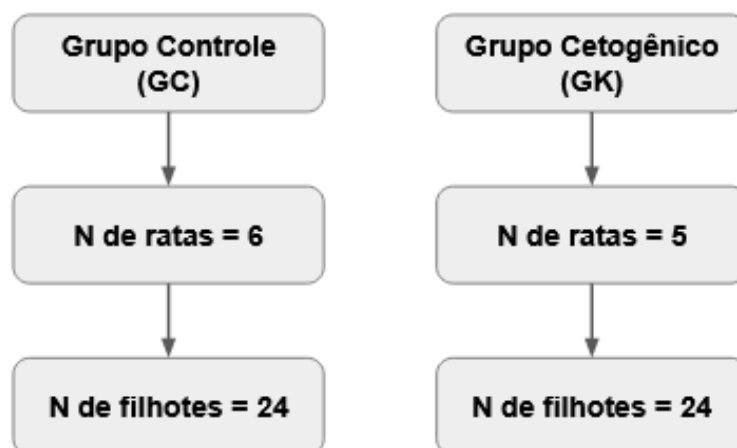


Figura 1. Desenho da divisão dos grupos experimentais expostos às dietas controle e cetogênica.

5.2 Manipulação dietética e grupos experimentais

Os grupos experimentais foram formados a partir da dieta administrada para as fêmeas (mães) após o parto até o final da lactação, ou seja, aos 25 dias de vida. Após o desmame, metade dos animais foram eutanasiados (12 animais de cada grupo experimental) e a outra seguiu no projeto até 60 dias de vida. Para estes animais a dieta ofertada foi a comercial (Presence). Assim, foram os seguintes grupos: 1) Grupo Controle (FGC, n=24 filhotes de mães que receberam dieta AIN-93G durante a lactação - 3,6kcal/g, 18% de proteínas, 63% de carboidratos e 19% de lipídios) (REEVES,1997); 2) Grupo Cetogênico (FGK, n=24 filhotes de mães que receberam dieta cetogênica durante a lactação - 5,4kcal/g; 19% de proteínas, 10% de carboidratos e 71% de lipídios) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição de macronutrientes, segundo o valor energético total (VET) das dietas AIN-93G, Cetogênica e Presence.

DIETAS*	Proteínas (% kcal VET)	Carboidratos (% kcal VET)	Lipídios (% kcal VET)	VET (kcal/g)
AIN-93G	18	63	19	3,6
Cetogênica	19	10	71	5,4
PRESENCE**	26	63	11	3,6

* Os cálculos da composição centesimal foram baseados nas informações nutricionais enviadas pela empresa fornecedora dos produtos e na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO).

** Determinado pelo Instituto Adolfo Lutz, 1985.

A dieta cetogênica foi desenvolvida a partir dos ingredientes e composição da AIN-93G, com alterações quantitativas e inclusão de alguns ingredientes. Para aumento do teor de lipídios e de ácidos graxos saturados foram adicionadas banha de porco e manteiga (Tabela 2). Assim, a DC apresentava cerca de 33,9% de gordura saturada em sua composição.

Tabela 2. Distribuição de nutrientes da dieta cetogênica desenvolvida a partir da AIN-93G.

INGREDIENTES	g/100g de dieta
Amido de milho (87%)	9,63
Caseína (80%)	29,00
Sacarose	5,00
Manteiga sem sal	1,00
Banha de porco	21,61
Óleo de soja (0,92g)	7,00
Fibra dietética	5,00
Mix mineral	3,50
Mix vitamínico	1,00
Metionina	0,61
Bitartarato de colina	0,64
TBHG	0,01
TOTAL	100,00

O desmame dos filhotes ocorreu com 25 dias de vida. Nesta idade, metade dos filhotes machos (n=24 nos dois grupos) e as genitoras foram eutanasiados para coleta de amostras biológicas. A outra metade seguiu no projeto até completar 60 dias de vida (n=24 nos dois grupos), idade que foram também eutanasiados para coleta de novas amostras de acordo com os procedimentos do projeto.

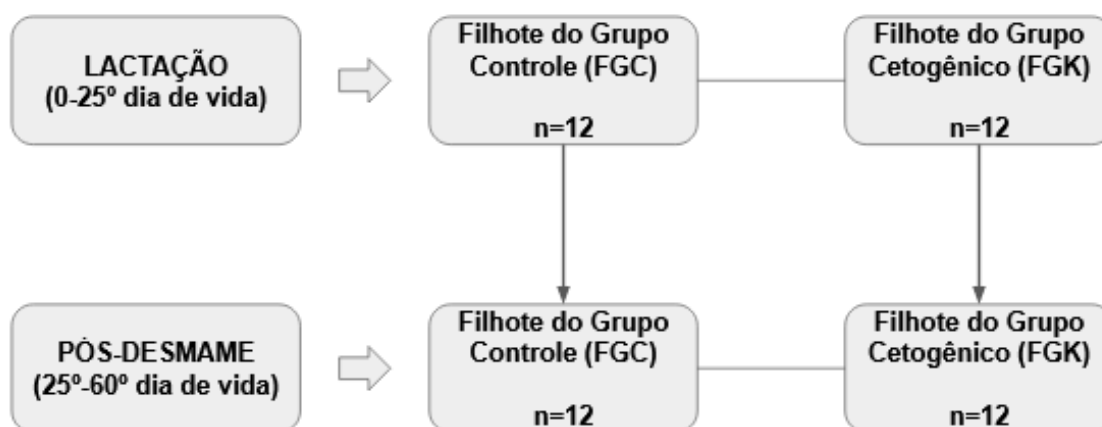


Figura 2. Detalhamento dos grupos experimentais expostos às dietas controle e cetogênica durante a lactação e no pós-desmame.

5.3 Procedimentos

5.3.1 Peso corporal da prole durante a lactação e após o desmame

O peso corporal dos animais de ambos os grupos foi estimado nos dias 1º, 5º, 11º, 17º, 21º e 25º, período esse que corresponde a lactação; e nos dias 30º e 60º período após o desmame. E para isso, uma balança eletrônica semi-analítica com precisão de 0,01g foi utilizada (modelo BL3200H, Marte). Também foram avaliados o percentual de ganho de peso nos períodos: 1º aos 25º dias de vida e do 30º ao 60º dias de vida.

5.3.2 Medidas murinométricas da prole durante a lactação

Foram mensuradas medidas murinométricas: eixo latero-lateral (ELLC), eixo ântero-posterior (EAPC) do crânio e o eixo longitudinal (EL) do corpo. Sendo assim, o ELLC representa a linha perpendicular ao EL, dividindo ao meio os pavilhões auditivos; para o EAPC considera-se a linha média entre o focinho e a região externa da crista occipital; e para o EL considera-se a distância entre o focinho e o ânus do animal. Para essas avaliações foi necessário a utilização de um paquímetro digital com precisão de 0,01mm (SILVA et al., 2005). Todas as avaliações ocorreram num período entre às 9hr e 10hr dos dias indicados e por um único pesquisador. As avaliações desta categoria ocorreram nos mesmos dias nos quais a avaliação do peso corporal da prole foi realizada.

5.3.3 Eutanásia e testes *post mortem*

Todas as eutanásias foram realizadas por decapitação por guilhotina, segundo consta na resolução normativa do CONCEA nº 37 de 15/02/2018, e seguindo as idades pontuadas pelo estudo (metade ao 25º dia de vida e a outra metade ao 60º dia de vida). Os animais passaram por um período de jejum de aproximadamente 10 a 12 horas. A partir desse procedimento ocorreu a coleta de amostras sanguíneas e fezes localizadas na porção do intestino grosso, assim como também foram coletados e pesados, o fígado e as gorduras retroperitoneal e visceral.

5.3.4 Coleta e homogeneização do sangue e dos tecidos

O sangue foi coletado com auxílio de um funil e assim acondicionado em um tubo para coleta de sangue a vácuo e estéril e com identificação; e as amostras de sangue passaram por um processo de centrifugação a 250rpm durante 20 minutos, e o soro obtido foi congelado em freezer a -80°C para as análises bioquímicas. Foram extirpados o fígado, gordura retroperitoneal e visceral e pesados em uma balança semianalítica com precisão de 0,01g (modelo BL3200H, Marte). Para os resultados foram considerados os pesos úmido e relativo dos órgãos em questão.

5.3.5 Análise dos parâmetros bioquímicos

A dosagem dos parâmetros bioquímicos dos animais aos 25 e 60 dias de vida, foram analisados os níveis séricos de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase; sendo os níveis de LDL E VLDL calculados de acordo com Friedewald et al. (1972). Em busca de resultados mais precisos, as análises foram realizadas em triplicata e através de ensaio colorimétrico de ponto final, segundo as recomendações do fabricante. Quanto a medição da absorbância, foi realizada em um espectrofotômetro e assim feita uma média entre as absorbâncias encontradas, após serem convertidas em mg/dL; para esse procedimento foram utilizados kits comerciais da marca *Bioclin*.

5.3.6 Análise da microbiota intestinal

Foram coletadas as amostras de fezes dos animais com 25 e 60 dias de vida para que o número de microrganismos vivos pudesse ser contabilizado. Sendo

assim, as amostras foram homogeneizadas em água peptonada (1 mg peptona por mL), e a partir disso foram diluídas em série no mesmo diluente (seis diluições). Uma parte do conteúdo das diluições em alíquotas (10µL) e em seguida foram inoculadas pela técnica de microgotas em placas de Petri estéreis contendo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) ágar (HiMedia, Índia) possibilitando assim que uma contagem de *Lactobacillus spp* fosse ser realizada; foi utilizado MRS + cisteína (0,05g por 100mL, Sigman-Aldrich, Milão, Itália) (cMRS) para a contagem de *Bifidobacterium spp.*; já no caso da contagem de *Enterobacteriaceae* foi utilizado MacConkey ágar (HiMedia, Índia) e para a contagem de *Bacteroides spp.* foi utilizado o Bacteroides Bile Esculina (BBE) ágar (Acumedia, EUA). Devido às características dos microrganismos em questão, a incubação apresentou condições de anaerobiose para a contagem de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Bacteroides spp.* e condições de aerobiose para a contagem de *Enterobacteriaceae*; o período de incubação durou cerca de 24 a 48 horas, e após esse período, o número de colônias viáveis em cada meio seletivo foi contabilizado e os resultados foram expressos como log UFC/g, sendo utilizado no teste um limite de detecção de 2 log UFC/g (DA SILVA et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2020).

5.4 Análise estatística

Para toda a análise estatística e construção gráfica, foi utilizado como recurso o software *Graphpad Prism® 5.0*, e assim os resultados obtidos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, sendo a normalidade dos dados verificada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. O teste “T” de Student’s não pareado foi utilizado para as análises do grupo controle com grupo cetogênico, enquanto para as análises dos grupos experimentais em idades diferentes foi utilizado o teste *ANOVA two-way* por medidas repetidas conforme as variáveis avaliadas e normalidade, seguido pelo pós-teste de Bonferroni se determinada diferença entre os grupos. E o nível de significância manteve-se em 5% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

Na figura 3A, é possível constatar que os filhotes do grupo cetogênico (FGK) apresentaram um maior peso corporal nos dias 17º e 25º quando comparado aos filhotes do grupo controle (FGC). Os animais não apresentaram diferença no peso corporal aos 30 dias de vida, entretanto aos 60 dias, o FGK apresentaram maior massa corporal que o grupo controle (Figura 3B). Ao avaliar o ganho de peso em diferentes períodos de vida dos animais, no intervalo 30 a 60 dias de vida o FGK apresentou menor percentual de ganho de peso. Nos outros períodos avaliados não apresentaram diferenças (Figura 3C).

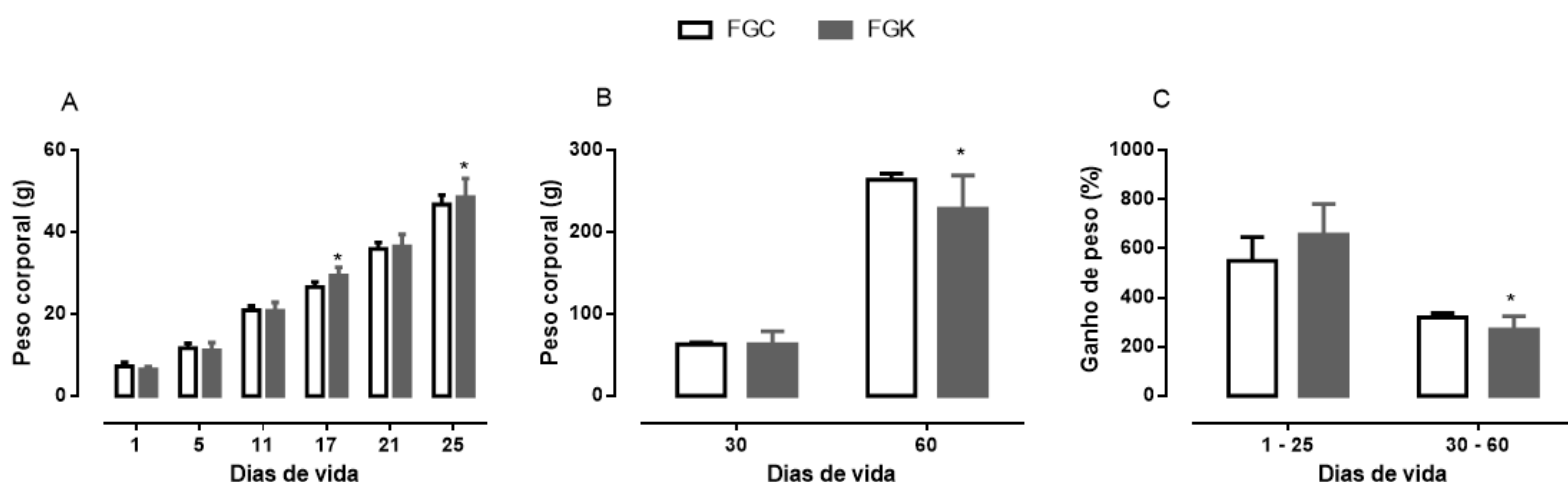


Figura 3. Peso corporal dos filhotes e o percentual de ganho de peso durante a lactação e no pós-desmame. FGC - Filhotes do Grupo Controle; FGK - Filhotes do Grupo Cetogênico. A - peso corporal durante a lactação; B - peso corporal no pós-desmame; C - percentual de ganho de peso durante a lactação e no pós-desmame. A, B e C: ANOVA-two way medidas repetidas seguidas do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$.

Analisando as medidas murinométricas, o FGK apresentou menor ELLC e EL nos 5º e 11º dias de lactação, como mostra na Figura 4A e 4C, e EAPC inferior no 5º dia de lactação (Figura 4B), quando comparado ao FGC. E no período após o desmame, os grupos não apresentaram diferenças significativas quanto aos parâmetros analisados (Figura 4).

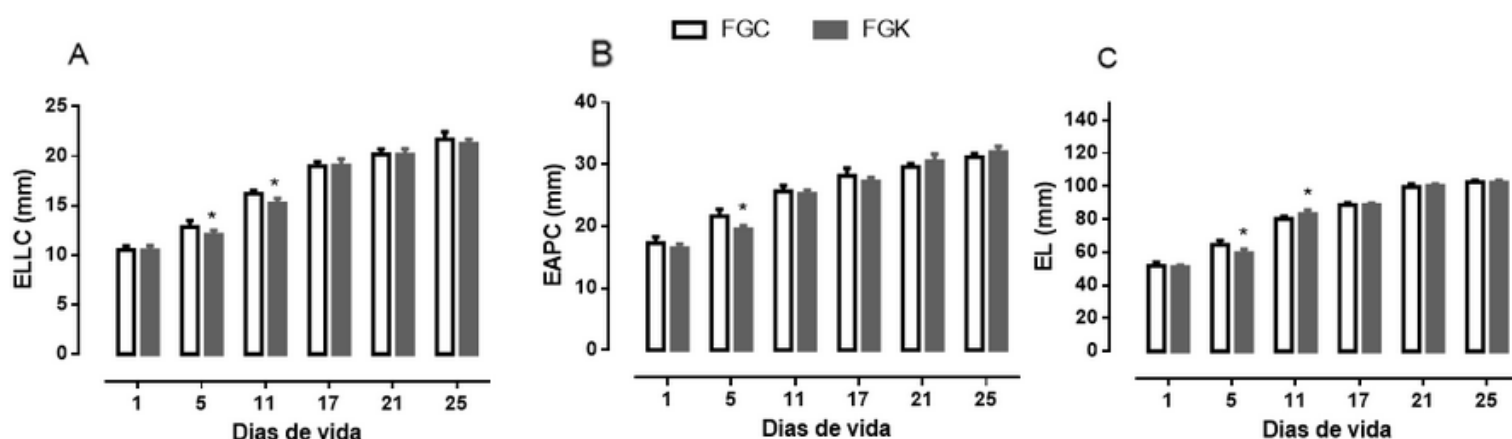


Figura 4. Medidas murinométricas analisadas no período da lactação. FGC - Filhotes do Grupo Controle; FGK - Filhotes do Grupo Cetogênico. A - ELLC; B - EAPC; C - EL. Valores representam média $\pm$ desvio padrão. ANOVA-two way medidas repetidas seguidas do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$.

A tabela 3 apresenta os resultados quanto ao peso úmido e relativo dos órgãos da prole aos 25º e 60º dias de vida. É possível observar que no 25º dia a gordura retroperitoneal foi maior no FGK do que no FGC, tanto no peso úmido quanto no relativo. O mesmo aconteceu nos animais com 60 dias de vida, com o acréscimo de que a gordura visceral também apresentou-se maior no FGK do que no FGC. Os grupos não apresentaram diferenças significativas quanto ao peso do fígado nas idades avaliadas.

Tabela 3. Peso dos órgãos da prole aos 25 e 60 dias de vida que foram submetidos a dieta cetogênica durante a lactação.

Peso Úmido dos órgãos	FGC	FGK	P
25 dias			
Fígado (g)	2,85 $\pm$ 0,52	2,40 $\pm$ 0,62	0,073
Gordura Visceral (g)	0,49 $\pm$ 0,18	0,47 $\pm$ 0,12	0,742
Gordura retroperitoneal	0,18 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,10*	0,000
Peso Relativo dos órgãos			

Fígado (g/100g)	6,01±1,21	5,14±1,43	0,093
Gordura Visceral (g/100g)	1,04±0,41	0,81±0,44	0,261
Gordura retroperitoneal (g/100g)	0,39±0,16	0,72±0,24*	0,000

60 dias

Fígado (g)	10,30±0,87	9,93±1,49	0,490
Gordura Visceral (g)	2,83±0,49	3,63±0,90*	0,025
Gordura retroperitoneal (g)	2,79±0,85	3,86±0,93*	0,015

Peso Relativo dos órgãos

Fígado (g/100g)	3,90±0,37	4,51±1,00	0,236
Gordura Visceral (g/100g)	1,07±0,18	1,50±0,38*	0,005
Gordura retroperitoneal (g/100g)	1,07±0,33	1,59±0,34*	0,002

FGC - Filhote Grupo Controle 25º dia (n=12); FGK - Filhote Grupo Cetogênico 25º dia (n=12); FGC - Filhote Grupo Controle 60º dia (n=12); FGK - Filhote Grupo Cetogênico 60º dia (n=12). *GC versus GK na mesma idade, teste estatístico "t" de Student *p<0,05.

Já na tabela 4, temos os resultados quanto aos parâmetros bioquímicos, sendo assim, o FGK aos 25 dias de vida quando comparados ao FGC apresentou uma maior concentração nas seguintes taxas: glicose, colesterol total, LDL, triglicerídeos e VLDL. As taxas continuaram apresentando um maior teor no FGK aos 60 dias de vida, com exceção da glicose que nessa idade apresentou um valor menor quando comparado ao FGC.

Tabela 4. Perfil bioquímico da prole aos 25 e 60 dias de vida que foram submetidos a dieta cetogênica durante a lactação.

Perfil Bioquímico	FCG	FKG	P
25 dias			
Glicose (mg/dL)	126,6±4,55	144,8±3,42*	0,003
Colesterol total (mg/dL)	107,5±4,93	127,7±4,74*	0,006

Triglicerídeos (mg/dL)	63,10±6,45	102,1±14,49*	0,020
VLDL (mg/dL)	12,62±1,29	20,43±2,89*	0,020
HDL (mg/dL)	55,96±1,92	55,02±1,08	0,674
LDL (mg/dL)	38,72±4,05	54,82±3,48*	0,006
ALT UI/L	25,23±2,18	20,42±1,32	0,073
AST UI/L	110,30±10,63	107,30±9,99	0,847

60 dias

Glicose (mg/dL)	138,5±2,06	125,9±5,14*	0,028
Colesterol total (mg/dL)	70,25±2,90	84,21±6,16*	0,048
Triglicerídeos (mg/dL)	50,23±4,77	65,27±5,28*	0,046
VLDL (mg/dL)	10,04±0,95	13,05±1,05*	0,046
HDL (mg/dL)	64,11±1,28	61,29±1,67	0,190
LDL (mg/dL)	4,09±1,03	25,21±6,02*	0,009
ALT UI/L	32,24±2,25	37,51±3,33	0,213
AST UI/L	71,32±8,77	86,91±9,68	0,249

FGC - Filhote Grupo Controle 25º dia (n=12); FGK - Filhote Grupo Cetogênico 25º dia (n=12); FGC - Filhote Grupo Controle 60º dia (n=12); FGK - Filhote Grupo Cetogênico 60º dia (n=12). *GC versus GK na mesma idade, teste estatístico "t" de Student *p<0,05.

Na figura 5 foram descritos os resultados da análise da microbiota intestinal dos animais de ambos grupos tanto no período da lactação quanto no pós-desmame. E em ambas idades, os animais do FGK apresentaram uma diminuição na quantidade de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. em comparação aos animais do FGC, assim como os animais do FGK apresentaram um aumento de *Enterobacteriaceae* spp. e *Bacteroides* spp. em comparação aos animais do FGC.

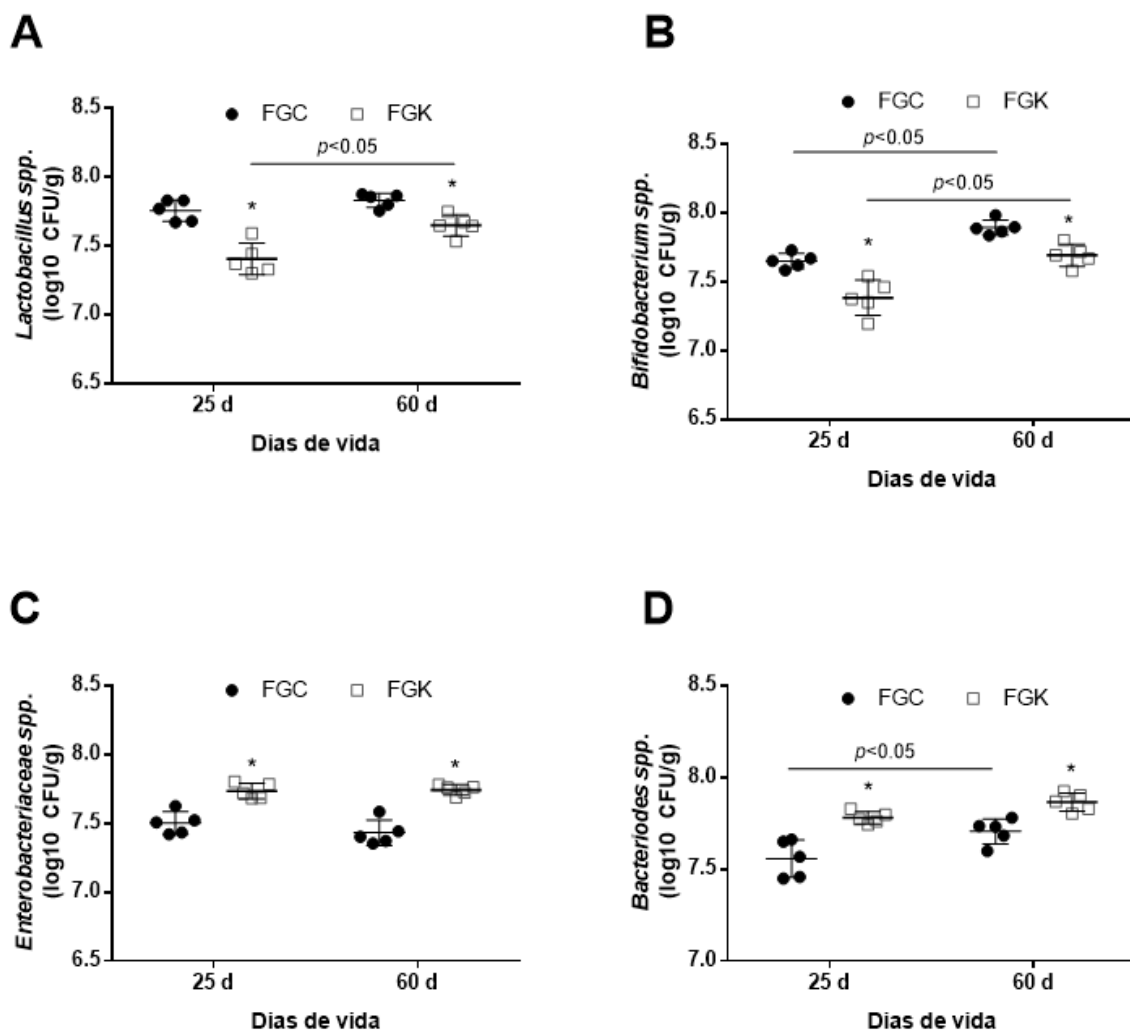


Figura 5. Efeito da ingestão de dieta cetogênica nas mães e repercussão na microbiota intestinal da prole durante o período de lactação e no pós-desmame. FGC - Filhotes do Grupo Controle; FGK - Filhotes do Grupo Cetogênico. A - contagem de *Lactobacillus* spp.; B - contagem de *Bifidobacterium* spp.; C - contagem de *Enterobacteriaceae*; D - contagem de *Bacteroides* spp. Valores representam média $\pm$ desvio padrão. ANOVA-two way medidas repetidas seguidas do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$.

7 DISCUSSÃO

Foi utilizado um modelo experimental de dieta cetogênica com um maior proporção de gordura saturada aplicada em ratas durante o período da lactação com o objetivo de avaliar por meio da hipótese da plasticidade fenotípica, se ao consumir dieta com maiores proporções de lipídios no período crítico da vida poderia promover alterações sobre os padrões de crescimento, bioquímicos e da microbiota intestinal da prole ao desmame e quando jovens. Os filhotes do grupo cetogênico (FGK) apresentaram maior peso corporal no momento do desmame e uma menor massa corporal aos 60 dias quando comparados aos filhotes do grupo controle (FGC); e não apresentaram alterações nas medidas murinométricas, sendo assim, mostra-se que a dieta cetogênica não influenciou o crescimento somático desses animais. Mas foi possível observar alterações nas quantidades de gordura visceral e retroperitoneal.

A dieta cetogênica utilizada durante a lactação não alterou os parâmetros de crescimento corporal e do crânio da prole no momento do desmame, mas influenciou a massa corporal durante a fase de aleitamento e de adultos jovens. Resultados semelhantes foram observados por Franco et al. (2012) e Cadena-Burbano et al. (2019), onde uma dieta hiperlipídica materna também promoveu um maior peso corporal e maior porcentagem de ganho de peso na prole no momento do desmame. Cadena-Burbano et al. (2019) ainda demonstraram contrastes com o nosso estudo relacionado às medidas murinométricas da prole no desmame, o estudo apresenta um maior crescimento corporal e do crânio dos animais.

O nosso estudo mostrou que no momento do desmame, o FGK apresentavam um maior peso corporal, e segundo as avaliações não apresentavam nenhum tipo de alteração quanto ao crescimento corporal e eixos do crânio; apesar disso, foi possível observar alterações dos eixos avaliados em dias pontuais durante a lactação, o que pode ser visto como uma possibilidade de maior sensibilidade da prole a dieta cetogênica nesses dias em questão. Corroborando ao nosso estudo, Mendes da Silva et al. (2014) ao ofertar dieta hiperlipídica com 52% de lipídios durante a gestação e lactação observaram menores dimensões corporais e cranianas nos animais ao desmame.

Pelo fato da dieta cetogênica ter sido ofertada apenas na lactação, as ratas deste grupo podem ter armazenado energia durante a lactação para a promoção da síntese do leite materno. Assim, no período perinatal o metabolismo materno é alterado para maximizar a eficiência no armazenamento dos nutrientes e a utilização destes na produção do leite, garantindo a sobrevivência da prole (HERRERA; AMUSQUIVAR, 2000; HERRERA et al, 2006). Esta maior demanda metabólica na produção do leite materno pode ter fornecido maior quantidade de gordura no leite, garantindo o maior peso corporal do FGK ao desmame. Assim, Butruille et al. (2019) mostrou que o consumo de gordura é principal fator da programação metabólica no período pós-natal relacionado por mudanças drásticas na composição do ácido graxo, no leite materno, ocasionando mudança no peso corporal da prole e aumento nos depósitos de gordura.

Relacionado ao peso dos órgãos, ao desmame o FGK além de apresentar uma maior massa corporal, também apresentava um aumento da deposição de gordura retroperitoneal. E aos 60 dias, quando os animais deste grupo foram avaliados novamente, apresentaram um menor peso corporal e elevadas quantidades de gorduras abdominais. Alguns estudos realizados mostram a relação entre o consumo de uma dieta materna rica em gordura e alterações quanto o aumento de peso corporal e tecido adiposo na prole (BAYOL et al., 2008; HOWIE et al., 2009; ESTADELLA et al., 2011; FRANCO et al., 2012; JACKSON et al., 2012). Ainda sendo possível observar casos onde uma dieta materna hiperlipídica gerou na prole um aumento de gordura abdominal que não foi acompanhado por aumentos na massa corporal dos animais (ANGÉLOCO et al., 2012; POMAR et al., 2017).

As dietas hiperlipídicas oferecem uma maior oferta de lipídios, o que gera ao organismo uma maior circulação de ácidos graxos livres que podem ser oxidados e assim desencadear uma maior síntese de célula adiposa. Assim, a sobrecarga de nutrientes, principalmente lipídios, é um grande promotor do aumento das células adiposas viscerais pois apresentam alta capacidade de replicação deste tecido (TCHKONIA et al., 2013; FERRARA et al., 2019). Isto pode estar relacionado ao maior teor de tecido adiposo visceral e retroperitoneal no final do experimento no FGK.

Além disso, os diferentes tipos de ácidos graxos presentes nas dietas podem resultar em respostas metabólicas distintas. O nosso modelo dietético com alto teor de lipídios também proporcionou maior proporção de ácido graxo saturado. Estudo realizado por Cerf (2010) observou relação da dieta rica em gordura saturada e maiores prevalências de resistência à insulina e do diabetes tipo II. Ademais, a resistência à insulina estava relacionada com o maior acúmulo de tecido adiposo corporal (AKAGIRI et al., 2008; SAMUELSSON et al., 2008; FRAULOB et al., 2010). Os resultados deste estudo evidenciam divergências na concentração da glicose nas idades de 25 e 60 dias de vida; o que pode ser explicado pela troca de dieta que ocorreu após o desmame dos grupos FGC e FGK, onde os mesmos passaram a consumir a dieta comercial utilizada no biotério até os 60º dias de vida.

Em relação aos parâmetros lipídicos séricos, o FGK apresentou maior concentração de colesterol total, LDL-col, VLDL-col, triglicerídeos em comparação ao FGC. Ao utilizar dieta hiperlipídica com 46% de lipídios em sua composição durante a gestação e lactação, Oliveira et al. (2011), observaram aumento nos níveis de colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos, VLDL; contribuindo assim para o desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta.

Santos et al. (2006) relataram que a gordura saturada é o principal fator determinante para a elevação do LDL, promovendo também uma maior entrada de colesterol nessa lipoproteína. Os ácidos graxos saturados são um fator que contribui para a dislipidemia e o desenvolvimento da aterosclerose (KITA et al., 2001; LIMA; COUTO, 2006). Assim como, existe a possibilidade de uma maior produção de triglicerídeos pelo fígado junto a um menor catabolismo dessa partícula, gerando um aumento nas concentrações de VLDL (OLIVEIRA et al., 2004). Benatti et al. (2014) descreveram a ativação das vias pró-inflamatórias a partir do consumo de uma dieta rica em gordura causando um estresse do retículo endoplasmático, uma deposição lipídica ectópica, resistência à insulina, além de contribuir para a obesidade e os riscos associados à mesma.

É possível encontrar achados literários que demonstram benefícios no consumo de uma dieta cetogênica, como: controle da massa corporal, no índice glicêmico e taxas de lipídios dos indivíduos (BOLLA et al., 2019; LI et al., 2022). E credita-se essas divergências com o nosso estudo à uma possível resposta aos

estímulos ambientais (dieta cetogênica) em um período crítico de desenvolvimento dos animais (lactação), gerando desfechos negativos na prole no momento do desmame e também quando adultos, validando assim a plasticidade fenotípica.

Quanto aos resultados sobre a composição da microbiota intestinal sob o efeito lactacional da dieta cetogênica foi observado que este modelo promoveu maior colonização de *Enterobacteriaceae spp* e *Bacteroides spp*, e uma menor concentração de *Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium spp*. Este resultado da microbiota é compatível com a análise da microbiota materna (resultado não descrito neste trabalho, mas já comprovado em estudo do nosso grupo de pesquisa). Assim, nota-se que a identidade da microbiota fecal das mães pode ser passada para a prole (PAIXÃO; CASTRO, 2016; CHONG; BLOOMFIELD; O'SULLIVAN, 2018).

Em uma concentração normal o *Lactobacillus spp* e o *Bifidobacterium spp* atuam com um probiótico, sendo uma espécie de proteção para as superfícies gastrointestinais, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (DO CARMO et al., 2020). Entretanto níveis aumentados de *Enterobacteriaceae spp* e *Bacteroides spp* geram desfechos negativos para a saúde dos indivíduos; a família *Enterobacteriaceae* abrange organismos que podem atuar como patógenos e quando em maior abundância relaciona-se a disbiose (WINTER et al., 2013; DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2016), além de possuírem propriedades pró-inflamatórias, contribuindo para o desencadeamento ou exacerbação da resposta inflamatória do hospedeiro (MORGAN et al., 2012; JALANKA et al., 2020); e o filo Bacteroidetes também está relacionado com a contribuição no desenvolvimento das doenças inflamatórias (VIGSNES et al., 2012; ILJAZOVIC et al., 2021).

Estudos realizados com a dieta cetogênica demonstram alterações na diversidade das espécies existentes na microbiota intestinal tanto em humanos como em ratos, caracterizando assim uma disbiose intestinal, sendo observado aumento das bactérias nocivas à saúde da microbiota e uma diminuição das bactérias benéficas (ZHANG et al., 2018; PAOLI et al., 2019). Além disso, as dietas ricas em gordura e a disbiose intestinal estão associadas a processos inflamatórios (PAOLI et al., 2019).

De acordo com o que foi apresentado por vários estudos, dietas ricas em gordura ou dieta cetogênica com alto teor de gordura saturada estão associadas a processos inflamatórios, disbiose intestinal e também a um aumento da deposição de gordura. Entretanto, não foram realizadas avaliações das respostas inflamatórias, o que por sua vez impossibilita avaliar se as alterações na microbiota intestinal possuem alguma ligação com as alterações encontradas no perfil bioquímico e o aumento dos depósitos de gordura, tornando de grande importância que a possibilidade da continuidade de pesquisas que estabeleçam uma associação mais clara da dieta cetogênica com alto teor de gordura saturada e microbiota intestinal seja estudada.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no que foi apresentado, pode-se constatar que a dieta cetogênica materna, rica em gordura saturada, durante a lactação levou a disbiose intestinal tanto materna quanto da prole, estando também associado a hipercolesterolemia e hipergliceridemia e alterações na glicemia da prole. Estas alterações bioquímicas, por sua vez, estão associadas ao aumento dos depósitos de gorduras abdominais. Por outro lado, a dieta cetogênica não interferiu no crescimento das dimensões corporais do FGK no momento do desmame.

Os resultados apresentados pelos filhotes do grupo cetogênico aos 60 dias de vida evidenciam os efeitos crônicos da utilização de uma dieta cetogênica e rica em gordura saturada durante o período lactação, o que por sua vez, evidencia a teoria da plasticidade fenotípica. O estímulo ambiental (dieta cetogênica) durante o período crítico do desenvolvimento (lactação) teve a capacidade de gerar alterações no perfil bioquímico, aumentou o depósito de gordura abdominal e alterou a composição da microbiota intestinal, ou seja uma disbiose intestinal, nos animais.

No entanto, fica evidente a importância de uma adequação nutricional, quando tratamos da oferta e da qualidade dos macronutrientes desde o início da vida para a saúde da microbiota intestinal e para parâmetros corporais e metabólicos equilibrados, e sabe-se que esses pontos estão extremamente ligados a prevenção de outros danos à saúde em um longo prazo.

REFERÊNCIAS

- AKAGIRI, S; NAITO, Y; ICHIKAWA, H; MIZUSHIMA, K; TAKAGI, T; HANDA, O; KOKURA, S; YOSHIKAWA, T. A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. 2008.
- ALDERMAN, H, et al. Evidence of Impact of Interventions on Growth and Development during Early and Middle Childhood. **Child and Adolescent Health and Development**, 3 ed. 2017.
- AMORIM, P.V; PADILHA, P.C; ACCIOLY, E. Dieta cetogênica e sua aplicação no cuidado de crianças portadoras de epilepsia: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.28, n.1, p.45-53. 2013.
- ANGÉLOCO, L.R.N; DEMINICE, R; LEME, I.A; LATARO, R.C; JORDÃO, A.A. Bioelectrical impedance analysis and anthropometry for the determination of body composition in rats: effects of high-fat and high-sucrose diets. **Revista de Nutrição**. 2012.
- ARMENO, M; et al. Consenso nacional sobre dieta cetogénica. **Revista de Neurologia**, v.59, n. 5, p.213-223. 2014.
- BARKER, A.J; BAIER, H. SInS and SOMs: neural microcircuits for size tuning in the zebrafish and mouse visual pathway. **Frontiers in neural circuits**. 2013.
- BAYOL, S.A; SIMBI, B.H; BERTRAND, J.A; STICKLAND, N.C. Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. **The Journal of Physiology**. 2008.
- BENATTI, R.O; MELO, A.M; BORGES, F.O; IGNACIO-SOUZA, L.M; SIMINO, L.A.P; MILANSKI, M; VELLOSO, L.A; TORSONI, M.A; TORSONI, A.S. Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and microRNA-122 (miR-122) and microRNA-370 (miR-370) expression in offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 12, p. 2112–2122. 2014.
- BIEN, J; PALAGANI, V; BOZKO, P. The intestinal microbiota dysbiosis and *Clostridium difficile* infection: Is there a relationship with inflammatory bowel disease? **Therapeutic Advances in Gastroenterology**. 2013.
- BOLLA, A.M; CARETTO, A; LAURENZI, A; SCAVINI, M; PIEMONTE, L. Low-Carb and Ketogenic Diets in Type 1 and Type 2 Diabetes. **Nutrients**. 2019.
- BONEY, C.M; VERMA, A; TUCKER, R; VOHR, B.R. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. **Pediatrics**. 2005.
- BRADSHAW, A.D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. **Advances in Genetics**, v. 13, p. 115-155, 1965.
- BUTRUILLE, L; MAROUSEZ, L; POURPE, C; OGER, F; LECOUTRE, S; CATHELIN, D; GORS, S; METGES, C.C; GUINEZ, C; LABORIE, C; DERUELLE,

P; EECKHOUTE, J; BRETON, C; LEGRAND, P; LESAGE, J; EBERLÉ, D. Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring. **International Journal of Obesity**. 2019.

CADENA-BURBANO, E.V; CAVALCANTI, C.C.L; LAGO, A.B; BENJAMIM, R.A.C; OLIVEIRA, T.R.D.P; SILVA, J.M; MANHÃES-DE-CASTRO, R; DA SILVA ARAGÃO, R. A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 98–109. 2019.

CERF, M.E. High fat programming of beta-cell failure. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 2010.

CHAVES, W.F; PINHEIRO, I.L; DA SILVA, J.M; MANHÃES-DE-CASTRO, R; ARAGÃO, R.S. Repercussions of maternal exposure to high-fat diet on offspring feeding behavior and body composition: a systematic review. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**. 2021.

CHONG, C.Y.L; BLOOMFIELD, F.H; O’SULLIVAN, J.M. Factors Affecting Gastrointestinal Microbiome Development in Neonates. **Nutrients**. 2018.

CHU, D.M; MA, J; PRINCE, A.L; ANTONY, K.M; SEFEROVIC, M.D; AAGAARD, K.M. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. **Nature Medicine**. 2017.

DO CARMO, M.C.L; MARTINS, I.M; BARBOSA, P.P.M; MACEDO, G.A; MACEDO, J.A. *Passiflora edulis* extract effects on probiotic and pathogenic modulation for healthier microbiota. **Nutrire**, v.45, n.15. 2020.

DONALDSON, G.P; LEE, M.S; MAZMANIAN, S. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**. 2016.

ESPÍRITO-SANTO, D.A; CORDEIRO, G.S; OLIVEIRA, T.W.S; SANTOS, L.S; SILVA, R.T; COSTA, C.A.S; BOAVENTURA, G.T; BARRETO-MEDEIROS, J.M. Exposure to a high-fat diet during intrauterine life and post-birth causes cardiac histomorphometric changes in rats: A systematic review. **Life Sciences**. 2022.

ESTADELLA, D; OYAMA, L.M; BUENO, A.A; HABITANTE, C.A; SOUZA, G.I; RIBEIRO, E.B; MOTOYAMA, C.S; NASCIMENTO, C.M.O. A palatable hyperlipidic diet causes obesity and affects brain glucose metabolism in rats. **Lipids Health Dis**. 2011.

FERRARA, D; MONTECUCCO, F; DALLEGRI, F; CARBONE, F. Impact of different ectopic fat depots on cardiovascular and metabolic diseases. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 12, p. 21630–21641. 2019.

FRANCO, J.G; FERNANDES, T.P; ROCHA, C.P; CALVIÑO, C; PAZOS-MOURA, C.C; LISBOA, P.C; MOURA, E.G; TREVENZOLI, I.H. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. **The Journal of Physiology**. 2012.

FRAULOB, J.C; OGG-DIAMANTINO, R; FERNANDES-SANTOS, C; AGUILA, M.B; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. 2010.

FRESE, S.A; MILLS, D.A. Birth of the infant gut microbiome: Moms deliver twice! **Cell Host and Microbe**, v. 17, n.5, p. 543-544, 2015.

FRIEDEWALD, W.T; LEVY, R.I; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**. 1972.

GINER, C.P, et al. Manual para o uso da dieta cetogénica. **Hospital Infantil Universitário Niño Jesús**. 2017.

GRENIER, S; BARRE, P; LITRICO, I. Phenotypic Plasticity and Selection: Nonexclusive Mechanisms of Adaptation. **Scientifica (Cairo)**. 2016.

HE, C; CHENG, D; PENG, C; LI, Y; ZHU, Y; LU, N. High-fat diet induces dysbiosis of gastric microbiota prior to gut microbiota in association with metabolic disorders in mice. **Frontiers in Microbiology**. 2018.

HERRERA, E; AMUSQUIVAR, E. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. **Diabetes Metab Research and Reviews**. 2000.

HERRERA, E; AMUSQUIVAR, E; LÓPEZ-SOLDADO, I; ORTEGA, H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. **Hormone Research**. 2006.

HONEYMAN, C.A.S; RIOS, M.A.L; DIEZ, P.R.H. Desarrollo de la microbiota gastrointestinal en lactantes y su rol en salud y enfermedad. **ARS MEDICA Journal of Medical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 35-43. 2016.

HOWIE, G.J; SLOBODA, D.M; KAMAL, T; VICKERS, M.H. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. **The Journal of Physiology**. 2009.

ILJAZOVIC, A; AMEND, L; GALVEZ, E.J.C; DE OLIVEIRA, R; STROWIG, T. Modulation of inflammatory responses by *Prevotella* gastrointestinal spp. From associations to functional studies. **International Journal of Medical Microbiology**. 2021.

INUZUKA-NAKAHARADA, L.M. Dieta cetogênica e dieta de Atkins modificada no tratamento da epilepsia refratária em crianças e adultos. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**. 2008.

JACKSON, C.M; ALEXANDER, B.T; ROACH, L; HAGGERTY, D; MARBURY, D.C; HUTCHENS, Z.M; FLYNN, E.R; MARIC-BILKAN, C. Exposure to maternal overnutrition and a high-fat diet during early postnatal development increases susceptibility to renal and metabolic injury later in life. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**. 2012.

JALANKA, J; CHENG, J; HIIPPALA, K; RITARI, J; SALOJARVI, J; RUUSKA, T; KALLIOMAKI, M; SATOKARI, R. Colonic Mucosal Microbiota and Association of

Bacterial Taxa with the Expression of Host Antimicrobial Peptides in Pediatric Ulcerative Colitis. **International Journal of Molecular Sciences**. 2020.

KANG, S.S; KURTI, A; FAIR, D.A; FRYER, J.D. Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring. **Journal of Neuroinflammation**. 2014.

KILLEN, S.L; GERAGHTY, A.A; O'BRIEN, E.C; O'REILLY, S.L; YELVERTON, C.A; McAULIFFE, F.M. Addressing the gaps in nutritional care before and during pregnancy. **Proceedings of the Nutrition Society**. 2022.

KIRK, S.L; SAMUELSSON, A.M; ARGENTON, M; DHONYE, H; KALAMATIANOS, T; POSTON, L; TAYLOR, P.D; COEN, C.W. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. **PLoS One**. 2009.

KITA, T; KUME, N; MINAMI, M; HAYASHIDA, K; MURAYAMA, T; SANO, H; MORIWAKI, H; KATAOKA, H; NISCH, E; HORIUCHI, H; ARAI, H; YOKODE, M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2001.

KOHLHEPP, L.M; HOLLERICH, G; VO, L; HOFMANN-KIEFER, K; REHM, M; LOUWEN, F; ZACHAROWSKI, K; WEBER, C.F. Physiological changes during pregnancy. **Anaesthesist**. 2018.

LEITÃO, R.B; NEVES, L. Períodos críticos para o desenvolvimento da obesidade: perspectivas da epigenética. **Alimentação Humana**. v. 22, n. 1. 2017.

LI, S; LIN, G; CHEN, J; CHEN, Z; XU, F; ZHU, F; ZHANG, J; YUAN, S. The Effect of Periodic Ketogenic Diet on Newly Diagnosed Overweight or Obese Patients with Type 2 Diabetes. **BMC Endocrine Disorders**. 2022.

LIMA, E.S; COUTO, R.D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 2006.

MCKENZIE, A.L; HALLBERG, S.J; CREIGHTON, B.C; VOLK, B.M; LINK, T.M; ABNER, M.K; GLON, R.M; MCCARTER, J.P; VOLEK, J.S; PHINNEY, S.D. A Novel Intervention Including Individualized Nutritional Recommendations Reduces Hemoglobin A1c Level, Medication Use, and Weight in Type 2 Diabetes. **JMIR Diabetes**. 2017.

MARTIN, K; JACKSON, C.F; LEVY, R.G; COOPER, P.N. Ketogenic diet and other dietary treatments for epilepsy. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**. 2016.

MENDES-DA-SILVA, C; GIRIKO, C.A; MENNITTI, L.V; HOSOUME, L.F; SOUTO, T; SILVA, A.V. Maternal high-fat diet during pregnancy or lactation changes the somatic and neurological development of the offspring. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. 2014.

MEROPOL, S.B; EDWARDS, A. Development of the infant intestinal microbiome: A bird's eye view of a complex process. **Birth Defects Research Part C - Embryo**

Today: Reviews, v. 105, n. 4, p. 228–239, 2015.

MORENO-SEPÚLVEDA, J; CAPPONI, M. The impact on metabolic and reproductive diseases of low-carbohydrate and ketogenic diets. **Revista Médica do Chile**. 2020.

MORGAN, X.C; TICKLE, T.L; SOKOL, H; GEVERS, D; DEVANEY, K.L; WARD, D.V; REYES, J.A; SHAH, S.A; LELEIKO, N; SNAPPER, S.B; BOUSVAROS, A; KORZENIK, J; SANDS, B.E; XAVIER, R.J; HUTTENHOWER, C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. **Genome biology**. 2012.

MORGANE, P.J; AUSTIN-LAFRANCE, R; BRONZINO, J; TONKISS, J; DÍAZ-CINTRA, S; CINTRA, L; KEMPER, T; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91-128. 1993.

MORGANE, P.J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 471–483. 2002.

MOST, J; TOSTI, V; REDMAN, L.M; FONTANA, L. Calorie restriction in humans: An update. **Ageing Research Reviews**. 2017.

NOVOPLANSKY, A. Developmental plasticity in plants: implications of non-cognitive behavior. **Evolutionary Ecology**, n.3, v.16, p. 177-188. 2002.

OLIVEIRA, C.L; MELLO, M.T; CINTRA, I.P; FISBERG, M. Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2. 2004.

OLIVEIRA, T.W.S; LEANDRO, C.G; DEIRÓ, T.C.B.J; PEREZ, G.S; SILVA, D.F; DRUZIAN, J.I; COUTO, R.D; BARRETO-MEDEIROS, JM. A perinatal palatable high-fat diet increases food intake and promotes hypercholesterolemia in adult rats. **Lipids**. 2011.

PAIXÃO, L.A; CASTRO, F.F.S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**. v.14, n.1, p.85-96. 2016.

PAPALIA, D. E; OLDS, S.W; FELDMAN, R.D. Desenvolvimento Humano. **ArtMed**. 8 ed., p. 48-58. 2006.

PAOLI, A; BIANCO, A; GRIMALDI, K.A; LODI, A; BOSCO, G. Long term successful weight loss with a combination biphasic ketogenic Mediterranean diet and Mediterranean diet maintenance protocol. **Nutrients**. 2013.

PAOLI, A; RUBINI, A; VOLEY, J.S; GRIMALDI, K.A. Beyond weight loss: A review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets. **European Journal of Clinical Nutrition**. 2013.

PAOLI, A; MANCIN, L; BIANCO, A; THOMAS, E; MOTA, J.F; PICCINI, F. Ketogenic Diet and Microbiota: Friends or Enemies? **Genes (Basel)**. 2019.

PEREIRA, E; ALVES, M; SACRAMENTO, T; ROCHA, V.L. Dieta cetogênica: como o uso de uma dieta pode interferir em mecanismos neuropatológicos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.9, p.78-82. 2010.

POMAR, C.A; VAN NES, R; SÁNCHEZ, J; PICÓ, C; KEIJER, J; PALOU, A. Maternal consumption of a cafeteria diet during lactation in rats leads the offspring to a thin-outside-fat-inside phenotype. **International Journal of Obesity**. 2017.

PÓVOA, H. O cérebro desconhecido: como o sistema digestivo afeta nossas emoções, regula nossa imunidade e funciona como órgão inteligente. **Rio de Janeiro. Editora Objetiva**, 222p. 2002.

RAIMANN, T.X; MARÍN, B.V; BURÓN, K.V; DEVILAT, B.M; UGALDE, F.A. Dieta cetogênica en epilepsia refractaria: Eficacia, evolución y complicaciones a largo plazo. **Revista Chilena de Pediatría**, v. 78, n. 5, p. 477-481. 2007.

RAMOS, A.M.F. Eficácia da Dieta Cetogênica no Tratamento da Epilepsia Refratária em Crianças e em Adolescentes. **Revista Neurociências**, v.9, n.3, p. 127-131. 2001.

RINNINELLA, E; CINTONI, M; RAOUL, P; LOPETUSO, L.R; SCALDAFERRI, F; PULCINI, G; MIGGIANO, G.A.D; GASBARRINI, A; MELE, M.C. Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition. **Nutrients**. 2019.

SAMUELSSON, A.M; MATTHEWS, P.A; ARGENTON, M; CHRISTIE, M.R; McCONNELL, J.M; JANSEN, E.H; PIERSMA, A.H; OZANNE, S.E; TWINN, D.F; REMACLE, C; ROWLERSON, A; POSTON, L; TAYLOR, P.D. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. **Hypertension**. 2008.

SANTOS, C.R.B; PORTELLA, E.S; AVILA, S.S; SOARES, E.A. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. **Revista de Nutrição**, vol.19, n.3. 2006.

SCHEINER S.M. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.24, p.35-68. 1993.

SCHLICHTING, C.D; SMITH, H. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. **Evolutionary Ecology**, n.3, v.16, p. 189-211. 2002.

SCHOELER, N. E; CROSS, J. H. Ketogenic dietary therapies in adults with epilepsy: a practical guide. **Practical Neurology**, v.16, n.3, p.208-214. 2016.

SILVA, H.J.; MARINHO, S.M.O.; SILVA, A.E.T.M.; ALBUQUERQUE, C.G.; MORAES, S.R.A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Protocol of mensuration to avaliation of indicators of somatic development of Wistar rats. **International Journal of Morphology**, v.23, p.227-230. 2005.

SOMA-PILLAY, P; NELSON-PIERCY, C; TOLPPANEN, H; MEBAZAA, A. Physiological changes in pregnancy. **Cardiovascular Journal of Africa**. 2016.

SULTAN, S.E; BAZZAZ, E.A. Phenotypic plasticity in *Polygonum persicaria*. In: Diversity and uniformity in genotypic norms of reaction to light. **Evolution**. 1993.

TAN, E.K; TAN, E.L. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**. 2013.

TCHKONIA, T; THOMOU, T; ZHU, Y; KARAGIANNIDES, I; POTHOUAKIS, C; JENSEN, M.D; KIRKLAND, J.L. Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 5, p. 644–656. 2013.

VEECH, R.L. The therapeutic implications of ketone bodies: The effects of ketone bodies in pathological conditions: Ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, n. 3, p. 309–319. 2004.

VERNOCCHI, P; DEL CHIERICO, F; PUTIGNANI, L. Gut Microbiota Profiling: Metabolomics Based Approach to Unravel Compounds Affecting Human Health. **Frontiers in Microbiology**. 2016.

VIGSNÆS, L.K; BRYNSKOV, J; STEENHOLDT, C; WILCKES, A; LICHT, T.R. Gram-negative bacteria are responsible for the main differences between the fecal microbiota of patients with ulcerative colitis and healthy controls. **Microbes Beneficial**. 2012.

VIZUETA, A.F.K. Efeitos da dieta cetogênica com diferentes composições de ácidos graxos poliinsaturados no metabolismo periférico e neuroglial de ratos wistar. **Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em ciências biológicas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

WEN, L.L; DUFFY, A. Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes. **The Journal of Nutrition**. 2017.

WEST-EBERHARD, M.J. Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, vol. 20; p. 249-278. 1989.

WEST-EBERHARD, M.J. Developmental plasticity and evolution. **Oxford University Press**. 2003.

WILSON, J.M; LOWERY, R. The Ketogenic Bible: The Authoritative Guide to Ketosis. **Victory Belt Publishing**. 2017.

WINTER, S.E; LOPEZ, C.A; BAUMLER, A.J. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. **EMBO reports**, v. 14,4, p. 319-27. 2013.

ZHANG, H; SPARKS, J.B; KARYALA, S.V; SETTLEAGE, R; LUO, X.M. Host adaptive immunity alters gut microbiota. **ISME Journal**, v. 9, n. 3, p. 770 - 781. 2015.

ZHANG, Y; ZHOU, S; ZHOU, Y; YU, L; ZHANG, L; WANG, Y. Altered gut microbiome composition in children with refractory epilepsy after ketogenic diet. **Epilepsy Research**. 2018.

ZHAO, L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. **Nature Reviews. Microbiology**. 2013.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer nº 111/2019 CEUA - UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126.8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 12 de dezembro de 2019

Ofício nº 113/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Giselia de Santana Muriz**

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição/ UFPE

processo nº 111/2019

Certificamos que a proposta intitulada " **Dieta cetogênica com alto teor de gordura saturada na lactação: efeito sobre a composição corporal, bioquímica e da microbiota intestinal na prole de ratos jovens.**", registrado com o **111/2019** sob a sponsabilidade de **Prof. Giselia de Santana Muriz** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 03/12/2019

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/12/2019 A 03/12/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico
Nº de animais	190
Peso/Idade	90 a 120 dias e filhotes das ratas/225-275g
Sexo	Macho (160) e (30) Femeas
Origem: Biotério de Criação	Biotério de criação do Departamento de Nutrição da UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério de criação do Departamento de Nutrição da UFPE