

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

Bruna Arruda de Souza

**COMPOSIÇÃO CORPORAL, CONSUMO ALIMENTAR E MICROBIOTA
INTESTINAL DE RATAS LACTANTES SOB EFEITO DA DIETA
CETOGENICA**

**RECIFE
2023**

**BRUNA ARRUDA DE
SOUZA**

**COMPOSIÇÃO CORPORAL, CONSUMO ALIMENTAR E MICROBIOTA
INTESTINAL DE RATAS LACTANTES SOB EFEITO DA DIETA
CETOGENICA**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção de grau de Nutricionista.

Orientadora: Giselia de Santana Muniz
Coorientador(a): Jakssuel Sebastion Dantas Alves

RECIFE

2023

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

Souza, Bruna Arruda de .
COMPOSIÇÃO CORPORAL, CONSUMO ALIMENTAR E MICROBIOTA
INTESTINAL DE RATAS LACTANTES SOB EFEITO DA DIETA
CETOGENICA / Bruna Arruda de Souza. - Recife, 2023.

43

Orientador(a): Giselia de Santana Muniz
Cooorientador(a): Jakssuel Sebastian Dantas Alves
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Nutrição - Bacharelado, 2023.
Inclui referências, anexos.

1. Dieta Cetogênica. 2. Microbiota. 3. Consumo Alimentar. 4. Composição
corporal. 5. Ratas Lactantes. I. Muniz, Giselia de Santana. (Orientação). II.
Alves, Jakssuel Sebastian Dantas. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

BRUNA ARRUDA DE
SOUZA

**COMPOSIÇÃO CORPORAL, CONSUMO ALIMENTAR E MICROBIOTA
INTESTINAL DE RATAS LACTANTES SOB EFEITO DA DIETA
CETOGENICA**

Monografia apresentada ao Curso de
Graduação em Nutrição da
Universidade Federal de Pernambuco
como requisito para obtenção de grau
de Nutricionista.

Aprovado em: 20/04/2023.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Giselia de Santana Muniz (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Juliana Maria Carrazzone Borba (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Tassia Karin Ferreira Borba (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

RESU MO

Introdução: A dieta cetogênica altera as proporções de distribuições normais dos macronutrientes e influencia alterações no metabolismo corporal. O aporte nutricional inadequado na gestação e/ou lactação pode acarretar riscos para saúde materna e da prole. A microbiota materna pode ser transmitida ao filho e pode ser alterada de acordo com a nutrição/alimentação. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da dieta cetogênica, rica em gordura saturada, sobre o consumo alimentar, peso corporal e dos órgãos e a microbiota intestinal em ratas lactantes. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 11 ratas lactantes, e de acordo com a dieta ofertada na lactação formaram-se dois grupos: grupo controle (GC, n=6) com dieta AIN-93G e grupo cetogênico (GK, n= 5) com uso de dieta cetogênica (5,4 cal/g; 19% proteínas, 10% carboidratos e 71% de lipídios), com ingredientes baseados na AIN93G. Durante o período da lactação foram avaliados o peso corporal e o consumo alimentar. Ao final da lactação (25 dias de vida do filhotes) houve a eutanásia das ratas e coletados o órgãos (fígado, tecido adiposo visceral e retroperitoneal) e a fezes para a análise da microbiota. Foram utilizados teste “T” de Student’s, o teste ANOVA *two-way* por medidas repetidas. O nível de significância foi $p < 0,05$. **Resultados:** O GK apresentou ao final da lactação menor peso corporal, mas aumento na quantidade de gordura visceral e retroperitoneal e fígado em relação ao GC. Houve menor consumo alimentar e maior ingestão energética em relação ao GC. Relacionado a microbiota, o grupo GK apresentou redução de bactérias probióticas e aumento de bactérias nocivas ao hospedeiro. **Conclusão:** A dieta cetogênica durante a lactação promoveu disbiose intestinal, associado ao aumento dos depósitos de gordura abdominal e menor peso corporal nas ratas lactantes.

Palavras-chave: Dieta Cetogênica; Microbiota; Consumo Alimentar; composição corporal; Ratas Lactantes.

ABSTRACT

Introduction: The ketogenic diet changes the proportions of normal macronutrient distributions and influences changes in body metabolism. Inadequate nutritional intake during pregnancy and/or lactation can pose risks to maternal and offspring health. The maternal microbiota can be transmitted to the child and can be altered according to nutrition/feeding. **Objective:** to evaluate the effects of the ketogenic diet, rich in saturated fat, on food consumption, body and organ weight and the intestinal microbiota in lactating rats. **Materials and Methods:** 11 lactating rats were used, and according to the diet offered during lactation, two groups were formed: control group (GC, n=6) with AIN-93G diet and ketogenic group (GK) with use of ketogenic diet (5.4 cal/g; 19% protein, 10% carbohydrates and 71% lipids), with ingredients based on AIN93G. During the lactation period, body weight and food consumption were evaluated. At the end of lactation (25 days of life of the pups) the rats were euthanized and the organs (liver, visceral and retroperitoneal adipose tissue) and feces were collected for microbiota analysis. Student's "T" test, the two-way ANOVA test for repeated measures were used. The significance level was $p < 0.05$. **Results:** The CG showed lower body weight at the end of lactation, but an increase in the amount of visceral and retroperitoneal fat and liver compared to the CG. There was lower food consumption and higher energy intake compared to the CG. Related to the microbiota, the GK group showed a reduction in probiotic bacteria and an increase in harmful bacteria to the host. **Conclusion:** The ketogenic diet during lactation promoted intestinal dysbiosis, associated with increased abdominal fat deposits, lower body weight in lactating rats.

Keywords: Ketogenic Diet; Microbiota; Food Consumption; body composition; Lactating Rats.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Lactação, metabolismo materno e composição corporal	11
2.2	Lactação: Dieta materna e e a influência no leite materno	12
2.3	Dieta hiperlipídica materna e consequências na prole	13
2.4	Dieta cetogênica	14
2.5	Dieta ricas em gordura e microbiota intestinal	17
3	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivo Geral:	20
3.2	Objetivos Específicos:	20
4	METODOLOGIA	21
4.1	Animais	21
4.2	Manipulação dietéticas e grupos experimentais	21
4.3	Procedimentos	22
4.3.1	Peso corporal	22
4.3.2	Consumo alimentar e energético	22
4.3.3	Quantificação de tecidos corporais	23
4.3.4	Análise da microbiota fecal	23
4.4	Análise estatística	24
5	RESULTADOS	25
6	DISCUSSÃO	28
7	CONCLUSÃO	33
_____	REFERÊNCIAS	34
_____	ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética Animal.	

1 INTRODUÇÃO

A dieta Cetogênica (DC) é um tipo de dieta hiperlipídica por conter alto teor de lipídios (60 a 80% de lipídios com relação ao valor calórico), entretanto este modelo dietético apresenta baixa quantidade de carboidratos ($\leq 10\%$ de carboidratos em relação ao valor calórico). Dessa maneira, essa dieta altera as proporções de distribuições normais dos macronutrientes e influencia no metabolismo corporal (VEECH, 2004).

A diminuição da disponibilidade adequada de carboidratos, mas especificamente de glicose, como fonte de energia, faz com que o fígado converta a gordura em ácidos graxos e produza corpos cetônicos, substituindo a glicose como fonte de energia primária. A primeira cetona produzida é o acetoacetato, mas é o β -hidroxibutirato a primeira na circulação. Em situações fisiológicas normais os níveis de cetonas circulantes são baixos (< 3 mmol/l), já em condições de consumo da dieta cetogênica, as concentrações das cetonas aumentam para 7-8 mmol/l. (GERSHUNI; YAN; MEDICI, 2018a). Assim, 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 o metabolismo energético corporal (VIZUETA, 2012).

O aporte nutricional inadequado na gestação e/ou lactação pode acarretar riscos para saúde materna e da prole (OSTLUND, HAGLUND e HANSON, 2004; ARMITAGE, TAYLOR e POSTON, 2005). Além disso, nas últimas décadas a hipótese da plasticidade fenotípica vem associando os consumos de dietas com alterações calóricas e desproporcionais em macronutrientes durante o período perinatal com alterações metabólicas na vida adulta (ARMITAGE, TAYLOR e POSTON, 2005), e outros estudos vem associando que estas alterações também comprometem a microbiota intestinal (ZHANG et al., 2015; FRESE, MILLS, 2015).

A microbiota materna pode ser transmitida ao filho, tendo como importante fator a alimentação na gestação e lactação (FRESE; MILLS, 2015; MEROPOL; EDWARDS, 2015). Os micro-organismos intestinais são importantes para a saúde do hospedeiro porque exercem papel tanto em nível metabólico como imunológico

(ROTHSCHILD et al., 2018; ZHANG et al., 2015). A terminologia microbiota faz referência à microbiota intestinal (MI), na qual é representada por microrganismos simbióticos, comensais e patogênicos. No intestino, é possível encontrar bactérias, vírus e fungos, sendo o microbioma a representatividade coletiva de todos esses microrganismos. As bactérias que habitam o TGI humano e de animais, na sua grande maioria pertencem à: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobactéria* e *Proteobacteria* (TAGLIABUE; ELLI, 2013). Essas populações microbianas são constituídas predominantemente de bactérias, como as dos filos *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* (gram-negativas), e *Firmicutes* e *Actinobactéria* (gram-positivas) (AL-ASSAL et al., 2018).

A alimentação possui uma estreita relação com o desenvolvimento da microbiota intestinal (ZHANG et al., 2015; FRESE, MILLS, 2015). Em estudo com mamíferos, a ingestão de gordura saturada, em protocolos de dieta hiperlipídica (HFD), aumentou a proporção de *Firmicutes* para *Bacteroidetes* (CÂNDIDO et al., 2018), assim como diminuir *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no intestino (BELL, 2015; STATOVCI et al., 2017).

Há algumas décadas alguns pesquisadores estão associando a absorção energética e os tipos de macronutrientes com a composição da microbiota intestinal, e como um dos fatores para o desenvolvimento da obesidade (TREMAROLI et al. 2010). Estudos em camundongos mantidos em condições *germ-free* mostraram que a microbiota intestinal promove aumento da adiposidade, aumentando a extração de energia dos alimentos e modulando os genes do hospedeiro que regulam o armazenamento de gordura (TREMAROLI et al. 2010; BACKHED et al., 2004). Outro estudo mostrou que a ingestão de *HFD* aumentou mediadores inflamatórios no íleo e cólon, resultando em ganho de peso, obesidade e resistência insulínica e que estes fatores estavam relacionados a baixa diversidade bacteriana intestinal (DING et al., 2010), principalmente quando associada a uma dieta rica em gordura saturada e trans (ZHANG; YANG, 2016). Já em humanos, também há relação da alteração microbiana com o sobrepeso/obesidade, desenvolvendo doenças metabólicas, especialmente pela inflamação de baixo grau (MARCHESI et al., 2016).

Mesmo havendo estudos com dietas ricas em gorduras e ocidentalizadas no período perinatal de roedores (BAYOL; FARRINGTON; STICKLAND, 2007; KRUSE

et al., 2016; PANTALEÃO et al., 2013), não foi demonstrada consequências da utilização de uma dieta rica em gordura e baixa em carboidrato, como a dieta cetogênica durante o período da lactação em ratas. É sabido que a baixa ingestão de carboidratos relaciona-se com a diminuição do consumo de fibras, prejudicando a microbiota intestinal. Dessa forma, é necessário fazer a associação a DC com níveis altos de gordura saturada com a lactação, para haver o entendimento das consequências metabólicas e na microbiota.

Com isso, esse trabalho buscou responder o seguinte questionamento: Poderia a DC, rica em gordura saturada, durante a lactação reduzir o peso corporal, as reservas energéticas (tecido adiposo) e a microbiota intestinal fecal de ratas quando consumida durante a lactação?

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lactação, metabolismo materno e composição corporal

A gestação e lactação são considerados períodos de rápido crescimento e desenvolvimento e a nutrição é fundamental para garantir a saúde da prole e das genitoras (WAARD et al., 2016). A nutrição materna equilibrada em calorias e nutrientes antes e durante o período de amamentação pode afetar o estado nutricional materno, principalmente alterando o peso e a composição corporal e pode alterar a composição dos nutrientes no leite materno resultando na saúde dos filhos (KOLETZKO et al., 2019).

A lactação é um processo fisiológico, anabólico e diversos mecanismos estão envolvidos. Dentre estes, há mudanças nas concentrações hormonais (menor secreção de progesterona e estrógenos e aumento na síntese de prolactina e ocitocina) (KOLETZKO et al., 2019). Quando a amamentação é iniciada, há alterações metabólicas no corpo materno que alteram a alocação de recursos do armazenamento para favorecer a síntese do leite (HYATT et al., 2017). Assim, no processo de síntese do leite há regulação do metabolismo energético, tais como o aumento da ingestão energética e a mobilização das reservas corporais de energia (ETTYANG et al., 2005).

A lactação pode beneficiar a mulher a curto e longo prazo, e está associada ao período de produção de leite da mulher (GUNDERSON, 2014). A involução uterina, a mobilização dos estoques energéticos e a mobilização e melhoria dos parâmetros lipídicos aumentados durante a gestação são considerados efeitos a curto prazo da lactação. Dentre os efeitos para a saúde da mulher a longo prazo associado a lactação, pode-se citar: a redução do risco de câncer de mama e ovário, da síndrome metabólica, das doenças cardiovasculares e possivelmente menor risco de diabetes tipo 2 a médio e longo prazo (McCLURE et al., 2012; TSCHIDERER et al., 2022).

A capacidade da mulher em promover a síntese de leite pode reorganizar o metabolismo dos macronutrientes a concentrações semelhantes ao período de não gestante, visto que na gestação há aumento da insulina e das taxas lipídicas (HYATT

et al., 2017). Entretanto, a amamentação resulta em melhor manuseio da glicose por meio de uma diminuição na produção de insulina, melhora da sensibilidade à insulina e queda na proliferação de células β . Além disso, o metabolismo lipídico é diminuído em tecidos metabolicamente ativos e os estoques lipídicos são mobilizados para facilitar o transporte de lipídios para a glândula mamária e para a síntese de leite. Assim, a lactação auxilia na redução da adiposidade pós-parto (HYATT et al., 2017).

Estudos epidemiológicos evidenciaram diminuição na prevalência de obesidade em mulheres que amamentaram em comparação com aquelas que não amamentaram (KOLETZKO et al., 2019; GUNDERSON, 2014). Mulheres lactantes comparadas com mulheres não lactantes apresentam parâmetros metabólicos mais favoráveis, incluindo menor concentração de lipídios sanguíneos aterogênicos, menor glicemia de jejum e pós-prandial, bem como insulina, e maior sensibilidade à insulina nos primeiros 4 meses após o parto (GUNDERSON, 2014).

2.2. Lactação: Dieta materna e a influência no leite materno

Um dos fatores cruciais durante o período de gestação e lactação é a nutrição que afeta o desenvolvimento dos órgãos destes mamíferos (OLIVEIRA, 2014). Além disso, os hábitos alimentares das mulheres antes, durante e após a gestação é fundamental para traçar o perfil do leite materno (ERICK, 2018).

A lactação é o processo de produção de leite materno; este alimento é nutricionalmente adequado e transmite benefícios imunológicos ao lactente. Para as mulheres nesta fase é uma atividade fisiologicamente e metabolicamente exigente que ocorre após o nascimento de um bebê (ERICK, 2018). A disponibilidade de nutrientes na circulação materna, a capacidade de transporte e a forma de oferta do leite materno está diretamente relacionado ao crescimento da prole. Caso haja alguma intercorrência em algum dos processos, haverá consequências de restrição ou de excesso nos filhotes (BRETT et al., 2014). Em mulheres nutridas, a composição do leite materno parece ser constante, mas pode haver mudanças na composição principalmente em proteínas e micronutrientes de acordo com os tipos de leite e com o avançar da lactação e o crescimento do bebê (ERICK, 2018). Além disso, alguns trabalhos sugerem que o conteúdo nutricional do leite materno não é

uniforme, mas dinâmico, refletindo a ingestão alimentar materna (AKCABOY et al., 2015; HONZIK et al., 2010; NGUYGEN et al., 2014).

Em estudo com lactantes nutridas e com carência nutricional na Venezuela foi observado alterações no conteúdo energético e de macronutrientes. Assim, quarenta amostras de leite materno foram obtidas de 20 mães desnutridas e 20 mães bem nutridas que tiveram filhos, com idade entre 15 dias e 6 meses, no pronto-socorro de uma enfermagem pediátrica. O leite materno de mães mal nutridas forneceu 20% menos calorias do que o leite das mulheres bem alimentadas (ACOSTA et al., 2009), menor conteúdo de proteínas e lipídios e pouca variação no conteúdo de carboidratos (ACOSTA et al., 2009; ERICK, 2018).

Com relação a produção de leite diária, alguns estudos evidenciam que há pouca variação no conteúdo de proteínas e carboidratos, entretanto, o conteúdo lipídico pode haver grandes variações (DEMMELMAIR and KOLETZKO, 2018; GROTE et al., 2016; INNIS, 2011). O teor de gordura tende a ser maior durante o dia e menor durante a noite (DEMMELMAIR and KOLETZKO, 2018). O leite humano fornece quase 50% da ingestão energética de lipídios para os lactentes jovens, correspondendo a uma ingestão em torno de 25 g/dia para a idade de até 6 meses (GIDREWICZ; FENTON, 2014; KOLETZKO et al., 2001).

A ingestão alimentar, o estilo de vida e a adiposidade materna são fatores que estão relacionados ao conteúdo lipídico no leite materno. Além do conteúdo lipídico, o tipo de ácidos graxos do leite humano podem ser modulados por fatores inerentes ou não à mãe (COSTA; SABARENSE, 2010). O leite das nutrizas de algumas regiões brasileiras apresenta os ácidos graxos essenciais, o ácido araquidônico, o ácido docosa-hexaenoico e um baixo percentual de ácidos graxos saturados e ácidos graxos trans (COSTA; SABARENSE, 2010).

2.3 Dieta hiperlipídica materna e consequências na prole

A programação metabólica dos filhotes de roedores está relacionada com o valor energético, macronutrientes e micronutrientes ofertados (OLIVEIRA, 2014). Há transportadores específicos na placenta responsáveis pelo transporte de aminoácidos, glicose, ácidos graxos e colesterol (BRETT et al., 2014). A dieta hiperlipídica, consumida pelas genitoras, influencia na composição dos lipídeos do

leite materno (ALBUQUERQUE et al., 2006). Além disso, como fonte de energia e substrato lipídico para o desenvolvimento do cérebro, os corpos cetônicos podem ser transferidos para o feto, tendo a possibilidade de atingir o mesmo nível plasmático materno (ALBUQUERQUE et al., 2006).

O tempo, tipo e percentual (45%-60%) de lipídeos dietéticos influenciam o crescimento fetal e pós-natal (CHRISTIANS et al., 2019). O uso de uma dieta com alto teor de gordura por 4-9 semanas antes da gestação favorece o crescimento fetal, (CHRISTIANS et al., 2019). E a dieta hiperlipídica oferecida em roedores durante a gestação e lactação favorece o ganho de peso e crescimento corporal da prole ao desmame MENDE-DA-SILVA et al., 2013).

Os ácidos graxos de cadeia longa (poli-insaturados), de dietas hiperlipídicas, são conduzidos de forma facilitada para o feto através da placenta durante a gestação, e transferidos a prole pelo leite materno durante a lactação (BRETT et al., 2014; ELIAS; INNIS, 2001). Já as dietas ricas em gordura saturada, no período perinatal aumentam a probabilidade na prole, quando na vida adulta, de desencadear alterações na função hepática, hiperglicemia, resistência insulínica, obesidade, hipertensão arterial e diabetes (LIANG; OEST; PRATER, 2009)

Entretanto, a utilização das dietas hiperlipídicas, a longo prazo, durante a lactação pode trazer prejuízos à saúde, como comprometimento da glicose, na lipogênese e/ou predispondo os filhotes à obesidade (VOGT et al., 2014). Estes autores demonstraram alterações do metabolismo ligado à glicose dos filhotes, hiperinsulinemia pela ativação anormal da sinalização da insulina, evidenciando que a exposição da mãe a dieta hiperlipídica é suficiente para predispor na prole à essas alterações (VOGT et al., 2014).

2.4. Dieta cetogênica

A Dieta Cetogênica (DC) é um tipo de dieta hiperlipídica que contém baixo teor de carboidratos e alta concentração de lipídios, podendo apresentar cerca de 10% em carboidratos, 20% de proteínas e 60 a 80% de lipídios (VARGAS et al., 2018; VEECH, 2004). Alguns modelos experimentais com dieta cetogênica podem chegar até 90% de lipídios em sua composição (GRANDL et al., 2018). Essas

mudanças nas proporções dos macronutrientes que ocorrem na DC levam à diversas modificações no metabolismo humano (VEECH, 2004).

A dieta cetogênica, mesmo sem diminuir calorias da dieta, é capaz de induzir ao organismo uma condição metabólica conhecida por Cetose Fisiológica. Essa condição envolve altos níveis de corpos cetônicos (*β -hidroxibutirato, acetoacetato e acetona*) circulantes no sangue. Quando esses corpos cetônicos estão na circulação em quantidades acima do fisiológico, eles se tornam mensuráveis (VEECH, 2004). Em condições normais, os níveis de cetonas são baixos (<3 mmol/l), porém, sob circunstância da dieta cetogênica, essa quantidade pode aumentar de ~0,5-3 mmol/l para níveis fisiológicos máximos de 7-8 mmol/l (GERSHUNI; YAN; MEDICI, 2018a). A cetose fisiológica ou nutricional é diferente da cetose ocorrida em decorrência à algumas condições, como cetoacidose diabética desencadeada pela Diabetes Mellitus tipo 1 (NEWTON; RASKIN, 2004).

A produção dos corpos cetônicos depende da glicose sanguínea e da disponibilidade de glicogênio hepático para distribuição celular. Quando estes níveis estão abaixo do necessário para as células, após ocorrer depleção do conteúdo de glicogênio e diminuição da concentração da glicose sanguínea, há formação dos corpos cetônicos para dar continuidade a funcionalidade fisiológica de quase todas as células do corpo. Contudo, esse processo ocorre somente em períodos de jejum, dietas restritivas de carboidratos, como a DC, e em indivíduos que estão sob treinamento intenso ou pela falta de insulina circulante, como na Diabetes Mellitus tipo I quando não tratada (DANIAL et al., 2013; GERSHUNI; YAN; MEDICI, 2018b).

O processo de cetogênese ocorre na matriz mitocondrial dos hepatócitos por conta do excesso de Acetil-CoA disponível e do desvio metabólico do oxaloacetato para gliconeogênese. Isso ocorre devido à ativação excessiva da lipólise (degradação de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol), seguida por beta-oxidação nas mitocôndrias hepáticas para produção de duas moléculas de acetil-CoA. O organismo, então, desvia metabolicamente o acetil-CoA para produzir Acetoacetil-CoA por ação de uma enzima tiolase, que é posteriormente convertido em β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) pela ação da HMG-CoA sintase, seguida da HMG-CoA liase que converte HMG-CoA em acetoacetato (DANIAL et al., 2013; FUKAO; LOPASCHUK; MITCHELL, 2004; GERSHUNI; YAN; MEDICI,

2018a). O acetoacetato pode ser transformado em acetona por descarboxilação não enzimática ou em β -hidroxibutirato por meio da enzima beta-hidroxibutirato desidrogenase. O acetoacetato e o β -hidroxibutirato podem ir para outros tecidos para serem utilizados para obtenção de energia (DANIAL et al., 2013; FUKAO; LOPASCHUK; MITCHELL, 2004; GERSHUNI; YAN; MEDICI, 2018a).

A DC vem sendo utilizada na terapêutica da epilepsia, no Parkinson e Alzheimer, visto que a DC parece ser capaz de regular as proteínas que possuem propriedades neuroprotetoras, buscando restaurar a homeostase celular (RAMAMURTHY; RONNETT, 2006). A literatura também evidencia associação positiva da DC em pacientes com doenças cardiovasculares. O seu efeito benéfico está associado ao LDL-colesterol, pois DC modula o tamanho das partículas de LDL-colesterol deixando-as mais flutuantes no plasma, o que diminui seu risco aterogênico (VOLEK; SHARMAN; FORSYTHE, 2005). Em humanos, a mudança do padrão dietético normal para uma dieta cetogênica seria capaz de melhorar os triglicerídeos séricos em jejum em -33%, a lipemia após uma refeição rica em gordura em -29% e a concentração sérica de insulina em jejum em -34% independente da perda de peso (SHARMAN et al., 2002).

A DC também é ligada à perda de peso corporal em humanos (MCKENZIE et al., 2017). Indivíduos que aderem a DC como padrão de dieta, com um consumo máximo de 50g de carboidratos por dia, tiveram maior perda de peso corporal (como desfecho primário) e também efeitos nos parâmetros de risco cardiovascular (como desfecho secundário) e menores níveis de triglicerídeos plasmáticos em comparação com uma dieta baixa em gordura (low-fat diet) (BUENO et al., 2013). Em humanos, os protocolos de dietas cetogênicas são considerados hipocalóricos, e esta condição pode ser preponderante na perda de peso (GARDNER et al., 2018). Além disso, boa parte dos indivíduos que utilizam a DC para este fim associa-se ao exercício físico, e alguns encontram-se em acompanhamento psicológico (OHSIEK; WILLIAMS; DEAN, 2011; SWIFT et al., 2018).

Estudos com ratos adultos alimentados com uma dieta cetogênica por 12 semanas, apresentaram tolerância diminuída à glicose, estresse no retículo endoplasmático hepático, esteatose por aumento no conteúdo de triglicerídeos hepáticos, lesão celular e acúmulo de macrófagos. GRANDL e colaboradores (2018)

demonstram que animais alimentados com uma DC apresentavam tolerância à glicose diminuída, associado ao quadro de resistência à insulina hepática (GRANDL et al., 2018). Estes efeitos demonstram que o consumo da dieta cetogênica em longo prazo parece estar associado a efeitos nocivos à saúde (GARBOW et al., 2011). Um estudo realizado em animais utilizando DC por curto período (21 dias), não demonstrou alteração no estado nutricional, perfil hepático, renal e lipídico (COLICA et al., 2017). Todavia, há dados que demonstram segurança no uso da DC por até dois anos (BROOM; SHAW; RUCKLIDGE, 2018; MA, 2019), mesmo não encontrando maiores vantagens em seu uso após um ano (BATCH et al., 2020).

Outrossim, há discussão na literatura sobre a relação da alimentação com o desenvolvimento do microambiente intestinal, podendo a ingestão alimentar (protocolos dietéticos ricos em gordura), durante a gestação e/ou lactação das ratas, influenciar o microbioma intestinal (HE et al., 2018; FRESE; MILLS, 2015; MEROPOL; EDWARDS, 2015).

2.5. Dieta ricas em gordura e microbiota intestinal

O Trato Gastrointestinal (TGI) é considerado uma das maiores interfaces entre o indivíduo, os fatores ambientais e os antígenos. Relata-se que em média 60 toneladas de alimentos passem por todo o TGI humano durante sua vida, além disso, uma demasia de microrganismos, que podem impor ameaça à integridade intestinal do hospedeiro (BENGMARK, 1998). A maioria dos microrganismos que compõem a microbiota intestinal pertencem à: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobactéria* e *Proteobacteria* (TAGLIABUE; ELLI, 2013). Essas populações microbianas são constituídas predominantemente de bactérias, como as dos filos *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* (gram-negativas), e *Firmicutes* e *Actinobactéria* (gram-positivas) (AL-ASSAL et al., 2018).

A microbiota intestinal pode ser passada de mãe para filho, mas sabe-se que fatores ambientais, além de relacionados à alimentação, o uso de medicamentos e outros fatores também são determinantes para a composição da microbiota intestinal. A forma de nascimento do indivíduo, por exemplo, pode ser uma forma de alteração da microbiota. Após nascimento de parto normal/natural, ocorre um aumento da quantidade de lactobacilos durante os primeiros dias de vida; ao

contrário do que acontece com bebês nascidos de cesariana, apresentando uma colonização prejudicada em *Bacteroides* (AVERSHINA et al., 2014; JAKOBSSON et al., 2014; ROTHSCHILD et al., 2018).

Os micro-organismos intestinais são fundamentais para fermentação dos substratos que não são digeríveis no TGI, possibilitando que fibras possam ser metabolizadas à Ácidos Graxos de Cadeia Curta (SCFA), como Acetato, Propionato e Butirato (TURNBAUGH et al., 2006). O butirato é considerado uma fonte de energia primária para as células do cólon do hospedeiro, tendo ainda efeitos sob a homeostase energética. Após transferência para o fígado, o propionato participa da regulação da gliconeogênese e a saciedade (DE VADDER et al., 2014). Já o acetato, é o SCFA em maior quantidade, considerado importante por exercer efeitos sobre a lipogênese e o metabolismo do colesterol, como também na regulação central do apetite (FROST et al., 2014).

A partir de estudos transcriptômicos, foi possível constatar que a microbiota do íleo é elevada pela capacidade que microrganismos têm em metabolizar açúcares simples, mostrando que a microbiota é capaz de se adaptar a disponibilidade de nutrientes no intestino delgado (ZOETENDAL et al., 2012). As dietas ricas em gordura saturada estão associadas com efeitos nocivos para a MI e com um estado metabólico prejudicial (WOLTERS et al., 2019). Esse tipo de dieta é relatado por modular a composição da MI e também a inflamação sistêmica de baixo grau, desequilibrando as colônias na MI, aumentando a proporção de *Firmicutes* para *Bacteroidetes* e outras mudanças nos níveis de família, gênero e espécie dos micro-organismos (CÂNDIDO et al., 2018). A dieta ocidental, rica em gordura saturada, apresenta alto teor de grãos refinados, sal, xarope de milho, açúcares simples e baixíssimas fontes de fibras alimentares. Dados têm demonstrado que a dieta ocidental é capaz de modificar o perfil da MI e promover um ambiente inflamatório, assim como diminuir a carga total de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no intestino (BELL, 2015; STATOVCI et al., 2017).

Em recente publicação, foi demonstrado que a DC seria capaz de alterar a microbiota intestinal de forma diferente de outros modelos de DHF e que essas mudanças estão relacionadas com a produção de corpos cetônicos. Além disso, foi

observado que o β -hidroxibutirato inibe o crescimento de bifidobactérias (ANG et al., 2020a).

Dessa forma, compreende-se que a diversidade, a composição e atividade metabólica da microbiota intestinal está associada à dieta e aos tipos de macronutrientes. Com isso, o intuito deste trabalho foi investigar a associação da dieta cetogênica ofertada às mães sobre a microbiota intestinal, consumo alimentar e peso corporal e dos órgãos durante a lactação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos da dieta cetogênica, rica em gordura saturada, sobre o consumo alimentar, peso corporal e dos órgãos e a microbiota intestinal em ratas lactantes.

3.2 Objetivos Específicos:

- Quantificar o peso corporal, fígado, gordura visceral e gordura retroperitoneal;
- Quantificar o consumo alimentar;
- Avaliar a microbiota intestinal fecal;

4 METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizadas 11 ratas *Wistar* nulíparas obtidas na colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo invertido de luz (20:00 às 8:00h) e escuridão (08:00 às 20:00h), temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com livre acesso à água e ração, mantidos em gaiolas de polipropileno (46cmx34cmx20cm) coberta com maravalha estéril. O projeto seguiu as normas do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, e as normas internacionais estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. O projeto foi aprovado sob nº111/2019 pela Comissão de Ética em Uso animal (CEUA) da UFPE (ANEXO A).

Para obtenção de neonatos, foram acasalados animais machos e fêmeas nulíparas (proporção 1:2), não consanguíneos, com idade entre 90 a 120 dias. O diagnóstico de possível fertilização foi realizado através do teste de esfregaço vaginal com visualização do espermatozoide. A gestação foi confirmada por acompanhamento da evolução ponderal. Com a confirmação da gestação, as ratas foram separadas dos machos e alojadas individualmente em gaiolas, e passaram a ter livre acesso à água e a ração comercial Presence. Após o nascimento da prole, as ratas (lactação) foram divididas em grupos de acordo com a dieta administrada *ad libitum*.

4.2. Manipulação dietética e grupos experimentais

Os grupos experimentais foram formados de acordo com a dieta ofertada após o parto até o final da lactação (25 dias) das ratas (HAHN; KIRBY, 1973). As dietas experimentais/grupos foram: Dieta AIN-93G para o grupo Controle (GC, n=6 lactação; 3,6 cal/g, 18% proteínas, 63% carboidratos e 19% de lipídios) (REEVES, 1993), e a dieta com baixo teor de carboidratos e alto em lipídios (Dieta Cetogênica) para o Grupo Cetogênico (GK, n=5 lactação; 5,4 cal/g; 19% proteínas, 10% carboidratos e 71% de lipídios) – Tabela 1. A dieta cetogênica foi desenvolvida com base na dieta AIN-93G com alteração quantitativa dos ingredientes e da proporção

dos macronutrientes, com acréscimo de fontes lipídicas, ricas em ácidos graxos saturados. A DC tem 33,9% de gordura saturada na sua composição.

Tabela 1. Composição de Macronutrientes e 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.

4.3 Procedimentos

4.3.1 Peso corporal

Foi realizada *in vivo* nas ratas lactantes a quantificação do peso corporal nos dias: 1º, 5º, 11º, 17º, 21º, 25º. Para quantificação do peso corporal foi utilizada uma balança eletrônica semianalítica com precisão de 0,01g (modelo BL3200H, Marte).

4.3.2 Consumo alimentar e energético

As rações AIN-93G e cetogênica foram ofertadas diariamente, e a ingestão alimentar das lactantes foi quantificada, através da diferença entre a cota ofertada e o rejeito mensurado após 24h. Para avaliação do consumo alimentar foi quantificado diariamente a diferença entre a oferta e o rejeito da dieta. Para análise foi considerado o total consumido durante a fase de lactação. O consumo energético

foi calculado multiplicando a quantidade de ração consumida pelo valor calórico de cada dieta.

4.3.3 Quantificação do tecidos corporais

Ao final do período da lactação houve a eutanásia das ratas por decapitação, após jejum de 10/ 12 horas. O fígado, gordura visceral e retroperitoneal foram pesados em balança semianalítica com precisão de 0,01g (modelo BL3200H, Marte). Para os resultados foram considerados o peso úmido e relativo dos órgãos.

4.3.3 Análise da microbiota fecal

Amostras de fezes das mães foram coletadas ao final da lactação dos filhotes (25 dias de vida da prole) para contagem do número de microrganismos viáveis. As amostras foram homogeneizadas em água peptonada (1 mg peptona por mL) e em seguida foram diluídas em série no mesmo diluente (seis diluições). Alíquotas de 10 µL das respectivas diluições foram inoculadas usando a técnica de microgotas em placas Petri estéreis contendo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) ágar (HiMedia, Índia) para contagem de *Lactobacillus* spp; MRS + cisteína (0,05 g por 100mL, Sigmam-Aldrich, Milão, Itália) (cMRS) para contagem de *Bifidobacterium* spp; MacConkey ágar (HiMedia, Índia) para contagem de *Enterobacteriaceae* e Bacteroides Bile Esculina (BBE) ágar (Acumedia, EUA) para contagem de *Bacteroides* spp. O processo de incubação foi realizado em condições de anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Okoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) para contagem de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Bacteroides* spp. e em condições aeróbias para a contagem de *Enterobacteriaceae*. Após um período de incubação de 24-48 horas, o número de colônias visíveis em cada meio seletivo foi contado e os resultados foram expressos como log UFC/g. O limite para detecção do teste foi de 2 log UFC/ g (DA SILVA et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2020).

4.4 Análise estatística

Para a análise estatística e construção dos gráficos foi utilizado o *software Graphpad Prism® 5.0*. Os resultados obtidos foram expressos em média \pm desvio padrão. A normalidade dos dados foi verificada a partir do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análises do grupo controle com o grupo cetogênico foi utilizado o teste “T” de Student’s. Para a análise do peso corporal 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. O nível de significância foi mantido em 5% ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

O peso corporal das ratas foi expresso na figura 1. GK apresentou peso corporal inferior ao GC nos dias 11º, 13º, 21º e 25º de lactação (*p<0,05). Com relação ao consumo alimentar das ratas ao final da lactação, o GK apresentou menor ingestão da dieta, entretanto houve maior consumo energético por este grupo em relação ao GC (Figura 2).

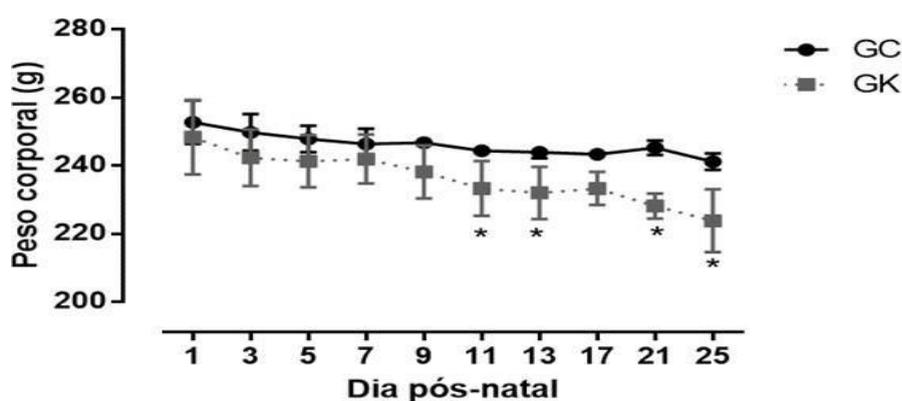


Figura 1. Peso corporal das ratas durante a lactação submetidas a dieta cetogênica e controle. GC- Grupo controle (n=6), GK= Grupo Cetogênico (n=5). Valores representam média ± desvio padrão. Peso corporal durante a lactação, ANOVA-two way medidas repetidas seguidas do pós-teste de Bonferroni, *p<0,05.

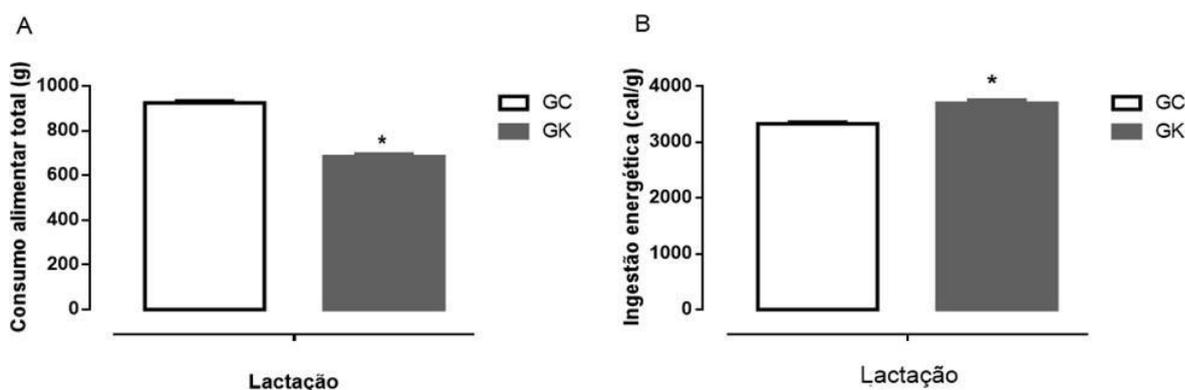


Figura 2. Consumo alimentar e energético total durante a lactação de ratas submetidas a dieta cetogênica e controle. Consumo alimentar (A), Ingestão energética (B). GC- Grupo controle (n=6), GK= Grupo Cetogênico (n=5). A e B: Teste estatístico “t” de Student, *p<0,05.

A tabela 2 descreve o peso dos órgãos das ratas ao final do período de lactação. As ratas GK apresentaram maior quantidade de gordura visceral e de gordura retroperitoneal em comparação com as ratas GC. O peso relativo do fígado, gordura visceral e gordura retroperitoneal foram maiores no GK quando comparado ao GC.

Tabela 2. Peso dos órgãos das mães submetidas a dieta cetogênica e controle durante a lactação.

Órgãos	CG	GK	P
Peso Úmido (g)			
Fígado	13,71±1,20	14,14±0,70	0,467
Gordura visceral	1,79±0,62	3,00±0,89*	0,021
Gordura retroperitoneal	2,09±0,72	3,27±0,89*	0,030
Peso Relativo (g/100g)			
Fígado	5,59±0,41	6,32±0,16*	0,002
Gordura visceral	0,73±0,25	1,33±0,37*	0,008
Gordura retroperitoneal	0,85±0,28	1,46±0,40*	0,000

Grupo Controle (GC, n=6) e Grupo cetogênico (GK, n=5). Foram utilizados os Teste T de Student's para comparação intergrupo. *GC versus GK na mesma idade. Foi considerado **p<0,05**.

Na Figura 3 foram quantificadas as bactérias fecais das ratas ao final do período da lactação (25 dias de vida). A dieta cetogênica reduziu as quantidades de bactérias probióticas (*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*) e aumentou as quantidades de bactérias nocivas à saúde do hospedeiro (*Bacteroides spp.*, *Enterobacteriaceae spp.*) quando comparado ao grupo controle.

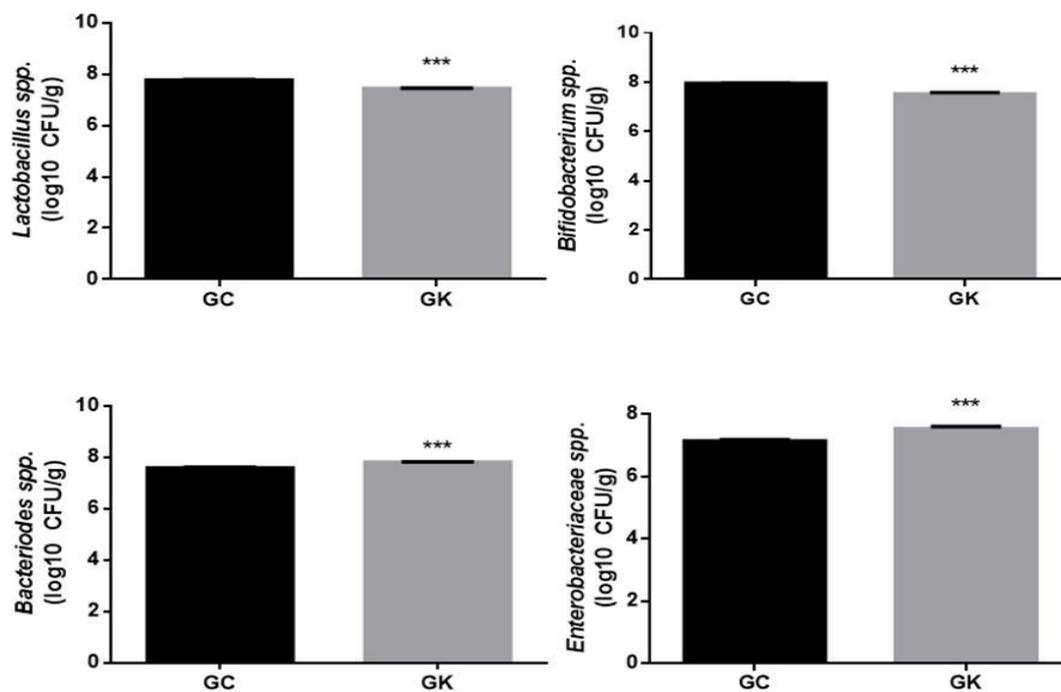


Figura 3. Contagem de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterobacteriaceae* e *Bacterioides* spp nas fezes de mães alimentadas com Dieta Cetogênica ou Controle.

GC= Mães grupo controle. GK= Mães grupo cetogênico. Valores representam média ± desvio padrão.

Teste estatístico “t” de Student, ***p<0,05**.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho utilizou como modelo experimental a dieta cetogênica durante a lactação para avaliar seus efeitos sobre o peso corporal e dos órgãos, consumo alimentar e microbiota intestinal em ratas lactantes. Esta dieta apresentou como principal característica o aumento substancial nas quantidades de lipídios e mais especificamente na quantidade de gordura saturada, e 10% do valor energético na contribuição por carboidratos. No que foi proposto em nossos objetivos, as mães que foram alimentadas com dieta cetogênica consumiram uma quantidade menor de dieta, porém, tiveram um consumo calórico maior comparado ao GC. As ratas GK apresentaram menor peso corporal no final da lactação, e principalmente maiores coxins de gordura visceral e retroperitoneal.

Alguns autores relacionam que em dietas hipercalóricas e/ou hiperlipídicas também há aumento na quantidade de proteínas. Este aumento protéico está diretamente relacionado com a capacidade saciogênica, na qual é relatado por um aumento na oxidação de aminoácidos pelo excedente consumido (PAOLI et al., 2015; WESTERTER-PLANTENGA et al., 2009). No presente estudo, o percentual calórico a partir de proteínas foi de 19% (dieta normoproteica), possivelmente sem excedentes proteicos para que o efeito na saciedade, resultando em menor quantidade de ração, estivesse relação com este mecanismo.

Assim, o menor consumo de ração está relacionado com a contribuição calórica da dieta, visto que resultou em maior consumo energético por estas ratas durante a lactação. A maioria das dietas com alto teor de lipídios apresentam-se como dietas hipercalóricas (PAOLI et al., 2015; WESTERTER-PLANTENGA et al., 2009). Dessa maneira, nossos resultados são congruentes à literatura por apresentarem diminuição do consumo alimentar, mas alta ingestão energética. Por ser uma dieta concentrada em lipídios, a cetogênica tem capacidade de supressão do apetite por promover o estado de plenitude (PAOLI et al., 2015).

A saciedade promovida pela dieta cetogênica pode estar relacionada à maior síntese dos corpos cetônicos e suas altas concentrações na corrente sanguínea suprimem o apetite. Esta via foi descrita em protocolos que administraram 3- β -hidroxibutirato, demonstrando exercer papel na saciedade em roedores por sua

alta concentração plasmática (ARASE et al., 1988). Os corpos cetônicos, não somente o 3- β -hidroxibutirato, podem atuar sobre os sinais anorexígenos e orexígenos, resultando em uma diminuição geral da percepção da fome e da ingestão de alimentos. A via anorexígena é ativada após uma refeição para aumentar os níveis de ácidos graxos livres (FFA) circulante, diminuindo assim, os níveis de Neuropeptídeo Y (NPY) cerebral, o que mantém a resposta da Colecistocinina (CCK), diminuindo a grelina circulante (PAOLI et al., 2015). Mesmo nosso estudo utilizando a dieta cetogênica em curto prazo, o efeito da mesma sobre o consumo alimentar parece acontecer da mesma forma quando é utilizada em estudo com longa duração, onde dietas com baixo teor de carboidrato são consideradas cetogênicas por promoverem à saciedade e diminuírem a ingestão de alimentos quando comparado com dietas não cetogênicas (JOHNSTONE et al., 2008).

A maior proporção de ácido graxo saturado na dieta cetogênica foi norteadada em observações práticas em humanos, devido a ideia de que pessoas que seguem esse tipo de protocolo têm uma ingestão maior de fontes alimentares ricas em gordura saturada, a fim do aumento no consumo lipídico. No presente estudo, a dieta cetogênica rica em gordura saturada, aumentou a quantidade de gordura visceral e retroperitoneal, além do peso relativo das gorduras e do fígado. Um estudo utilizando a DC com maiores quantidades de banha de porco (rica em ácido graxo saturado) por seis semanas mostrou que os animais alimentados com DC apresentaram maior quantidade de gordura visceral do que ratos alimentados com dieta controle. Esta gordura visceral aumentada foi relacionada a uma maior atividade da fosfoenolpiruvato carboxicinase, fornecendo glicerol 3-fosfato para síntese de triglicerídeos, aumentando o acúmulo de gordura pela lipogênese bem como intolerância à glicose (RIBEIRO et al., 2008).

Por outro lado, mesmo com maior quantidade de gordura corporal, as ratas apresentaram, neste estudo, menor peso corporal. Sabe-se que durante o 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 (DEMMELMAIR; KOLETZKO, 2018). Assim, quando a amamentação é exclusiva, há maior mobilização das reservas corporais materna

garantindo as calorias e os nutrientes para a eficiência da lactação (SILVA et al., 2022; WAARD et al., 2016; THOEN et al., 2015; REHFELDT et al., 2012). A lactação implica mudanças no meio endócrino materno, favorecendo uma perda de peso que é altamente variável (interpessoal), e que sugere que não há uma relação linear entre a amamentação e a perda de peso (WAARD et al., 2016). Contudo, mesmo não realizando a quantificação da massa magra das ratas e devido a maior quantidade de tecido adiposo, hipotetizamos que a dieta cetogênica pode ter contribuído na perda de tecido muscular.

Mesmo a DC apresentando mecanismos distintos das dietas ricas em gorduras sobre a microbiota intestinal (MI), os efeitos na disbiose relacionados à inflamação e excesso de gordura corroboram-se, assim como o excesso de gordura abdominal e alterações da MI deste trabalho. Em camundongos, estudo utilizando dieta hiperlipídica (60% de gordura) por oito semanas apresentaram infiltração de macrófagos e inflamação no tecido adiposo, associado ao aumento de citocinas pró-inflamatórias circulantes, além disso, a dieta promoveu aumento de *Enterobacteriaceae* na MI. Estes fatores foram associados à inflamação por translocação de produtos microbianos do intestino para a corrente sanguínea (Lipopolissacarídeos – LPS) (CANI et al., 2007) e devido ao aumento de *Enterobacteriaceae* na microbiota intestinal fecal (KIM et al., 2012). Esse aumento de LPS está associado à síndrome metabólica por aumentar de forma crônica os níveis de insulina em jejum, aumento de triglicerídeos hepáticos e de tecido adiposo visceral, além de outros marcadores como Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), Interleucina -1, Interleucina-6 (CANI et al., 2007).

Ademais, a associação da DC durante a lactação e seu efeito na microbiota intestinal (MI) fecal materna resultou em maior colonização de *Enterobacteriaceae* spp e *Bacteroidetes* spp, e menor concentração de *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp. Sabe-se que o aumento de *Enterobacteriaceae* e *Bacteroides* spp estão associados a eventos deletérios a saúde como a disbiose intestinal e inflamação (ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017). Em níveis normais, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp exercem papel probiótico (AZAD et al., 2018). Logo, alterações na concentração dessas bactérias estão ligadas a desfechos negativos para a

saúde. Assim, as diferentes proporções dos macronutrientes da dieta cetogênica foi capaz de modificar a composição das bactérias da microbiota intestinal.

A associação com diferentes dietas e suas correlações na microbiota intestinal vem sendo investigada (AZAD et al., 2018; ANG et al., 2020b). Um estudo recente mostrou que a DC ao elevar os níveis séricos β -hidroxibutirato foi capaz de inibir seletivamente o crescimento bifidobacteriano por ocasionar uma diminuição de células do tipo Th17 intestinal, sendo essas células participantes na patogênese de doenças como a doença de Crohn, Colite e Esclerose, evidenciado a partir de experimentos *in vitro* e *in vivo* (roedor), por análises metagenômica e metabolômica o papel que a DC desempenha sobre a microbiota intestinal é diferente das dietas hiperlipídicas tradicionais (ANG et al., 2020b).

Dietz et al., (2019) observaram que a prole de mães alimentadas com dietas hiperlipídicas apresentaram maior quantidade de gordura visceral, menor concentração de *Lactobacillus* spp e maior concentração de *Bacteroides* spp. Além disso, tanto a mãe como a prole apresentaram danos nas vilosidades intestinais, aumentando a permeabilidade intestinal, e alteração no metabolismo lipídico, mostrando que dieta hiperlipídica é associada a complicações na saúde da prole (DIETZ et al., 2019). De forma semelhante a nossos dados, estudos que utilizam dietas hiperlipídicas com gordura saturada ofertada durante os períodos iniciais da vida estão ligados às mudanças nos perfis da microbiota intestinal, aumentando a proporção de Firmicutes para Bacteroidetes, sendo este um efeito adverso em comparação aos resultados com as dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados (RODRÍGUEZ et al., 2015).

Em síntese, os achados nesse estudo reforçam a importância de avaliar a lactantes durante esta fase de grande variação metabólica, visto que alterações na composição leite materno estão relacionados distúrbios metabólicos na vida adulta na prole e pode também promover mudanças fisiometabólicas materna. A dieta materna rica em lipídeos e pobre em carboidratos mostrou grande influência nas lactentes ao promover alterações no peso corporal e nas reservas de tecido adiposo e alterações na composição da microbiota fecal. Nosso estudo também evidencia que não é só a quantidade de gordura na dieta materna que acarreta esses efeitos



deletérios na saúde da prole, mas também a qualidade dos lipídeos presentes na dieta.

7 CONCLUSÃO

A ingestão da dieta cetogênica rica em gordura saturada, durante a lactação, promoveu uma disbiose intestinal associada ao aumento no consumo energético, do peso do fígado e dos depósitos de gordura abdominal porém com um menor peso corporal nas ratas lactantes. Pode haver uma associação entre o consumo da dieta cetogênica lactação com perda de massa magra, mas é necessários mais estudos. Dessa forma, esses dados demonstram a importância da adequação nutricional durante a lactação e na saúde materna.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, T. A. et al. Macronutrientes em leite de mães desnutridas. **Archivos Lactinamericanos de Nutrition** , 2009

AKCABOY, M. et al. Deficiência de vitamina B12 em bebês. **Indian J Pediatr**, 2015.

AL-ASSAL, K. et al. Gut microbiota and obesity. **Clinical Nutrition Experimental**,, 2018.

ALBUQUERQUE, K. T. et al. Intake of trans fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. **Nutrition**, 2006.

ANG, Q. Y. et al. Ketogenic Diets Alter the Gut Microbiome Resulting in Decreased Intestinal Th17 Cells. **Cell**, 2020a.

ANG, Q. Y. et al. Ketogenic Diets Alter the Gut Microbiome Resulting in Decreased Intestinal Th17 Cells. **Cell**, 2020b.

ARASE, K. et al. Intracerebroventricular infusions of 3-OHB and insulin in a rat model of dietary obesity. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**,, 1988.

ARMITAGE, J. A.; TAYLOR, P. D.; POSTON, L. Experimental models of developmental programming: Consequences of exposure to an energy rich diet during development. **Journal of Physiology**, 2005.

AVERSHINA, E. et al. Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. **FEMS Microbiology Ecology**, 2014.

AZAD, M. A. K. et al. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. **BioMed Research International**, 2018.

BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Procc Natl Sci U S A*, 2004.

BATCH, J. T. et al. Advantages and Disadvantages of the Ketogenic Diet : A Review Article., 2020.

BAYOL, S. A.; FARRINGTON, S. J.; STICKLAND, N. C. A maternal “junk food” diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for “junk food” and a greater propensity for obesity in rat offspring. **British Journal of Nutrition**, 2007.

BELL, D. S. H. Changes seen in gut bacteria content and distribution with obesity: Causation or association? **Postgraduate Medicine**, 2015.

BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**, 1998.

BRETT, K. E. et al. Maternal–Fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: The role of the placenta. **International Journal of Molecular Sciences**, 2014

BROOM, G. M.; SHAW, I. C.; RUCKLIDGE, J. J. PT US CR. **Nutrition**, 2018.

BUENO, N. B. et al. Very-low-carbohydrate ketogenic diet v. low-fat diet for long-term weight loss: a meta-analysis of randomised controlled trials. **British Journal of Nutrition**, 2013.

CADENA-BURBANO, E. V. et al. A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. **Nutritional Neuroscience**, 2019.

CÂNDIDO, F. G. et al. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 2018.

CANI, P. D. et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, 2007.

CHRISTIANS, J. K. et al. Effects of high-fat diets on fetal growth in rodents: A systematic review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2019.

COLICA, C. et al. Efficacy and safety of very-low-calorie ketogenic diet : a double blind randomized crossover study. 2017.

COSTA, A. G. V.; SABARENSE, C. M. Modulation and composition of fatty acids in human milk. *Rev. Nutr.*, 2010

DANIAL, N. N. et al. How Does the Ketogenic Diet Work? Four Potential Mechanisms. **Journal of Child Neurology**, 2013.

DA SILVA, J. K. et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. **Food Research International**, 2013.

DEMMELMAIR, H.; KOLETZKO, B. Lipids in human milk. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, 2018.

DE OLIVEIRA, Y. et al. Oral administration of *Lactobacillus fermentum* post-weaning improves the lipid profile and autonomic dysfunction in rat offspring exposed to maternal dyslipidemia. **Food & function**, 2020.

DE VADDER, F. et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. **Cell**, 2014.

DIETZ, A. J. et al. Maternal dyslipidaemic diet induces sex-specific alterations in intestinal function and lipid metabolism in rat offspring. **British Journal of Nutrition**, 2019.

DING, S. et al. High-fat diet: Bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. **PLoS ONE**, 2010.

ELIAS, S. L.; INNIS, S. M. Infant plasma trans, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2001.

ERICK, M. Breast milk is conditionally perfect. **Medical Hypotheses**, 2018.

ETTYANG, G. A. et al. Assessment of body composition and breast milk volume in lactating mothers in pastoral communities in Pokot, Kenya, using deuterium oxide. **Ann Nutrition Metabolism**, 2005.

FRESE, S. A.; MILLS, D. A. Birth of the infant gut microbiome: Moms deliver twice!
Cell Host and Microbe, 2015.

FROST, G. et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. **Nature Communications**, 2014.

FUKAO, T.; LOPASCHUK, G. D.; MITCHELL, G. A. Pathways and control of ketone body metabolism: On the fringe of lipid biochemistry. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 2004.

GARBOW, J. R. et al. Hepatic steatosis, inflammation, and ER stress in mice maintained long term on a very low-carbohydrate ketogenic diet. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, 2011.

GARDNER, C. D. et al. Effect of low-fat VS low-carbohydrate diet on 12-month weight loss in overweight adults and the association with genotype pattern or insulin secretion the DIETFITS randomized clinical trial. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, 2018.

GERSHUNI, V. M.; YAN, S. L.; MEDICI, V. Nutritional Ketosis for Weight Management and Reversal of Metabolic Syndrome. **Current Nutrition Reports**, 2018a.

GRANDL, G. et al. Short-term feeding of a ketogenic diet induces more severe hepatic insulin resistance than an obesogenic high-fat diet. 2018.

GIDREWICZ, D. A.; FENTON, T. R. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. **BMC Pediatr**, 2014.

GROTE, V. et al. Breast milk composition and infant nutrient intakes during the first 12 months of life. **Eur J Clin Nutr**, 2016.

GUNDERSON, E. P. Impact of Breastfeeding on Maternal Metabolism: Implications for Women with Gestational Diabetes. **Curr Diab Rep**. 2014.

HAHN, P.; KIRBY, L. Immediate and late effects of premature weaning and of feeding a high fat or high carbohydrate diet to weanling rats. **Journal of Nutrition**, 1973.

HE, C. et al. High-fat diet induces dysbiosis of gastric microbiota prior to gut microbiota in association with metabolic disorders in mice. **Frontiers in Microbiology**, 2018.

HONZIK, M. et al. Apresentação clínica e consequências metabólicas em 40 lactentes com deficiência nutricional de vitamina B12 - o que aprendemos?. **Eur J Pediatr Neurol** , 2010.

HUANG, Y. et al. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation affects hepatic lipid metabolism in early life of offspring rat. **Journal of Biosciences**, 2017.

INNIS, S. M. Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition. **Adv Nutr**, 2011.

HYATT, H. W. et al. Lactation has persistent effects on a mother's metabolism and mitochondrial function. **Scientific Reports**, 2017.

JAKOBSSON, H. E. et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. **Gut**, 2014.

JOHNSTONE, A. M. et al. Effects of a high-protein ketogenic diet on hunger, appetite, and weight loss in obese men feeding ad libitum. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2008.

KIM, K. A. et al. High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. **PLoS ONE**, 2012.

KOLETZKO, B. et al. Nutrition during pregnancy, lactation, and early childhood and its implications for maternal and long-term child health: the EarlyNutrition Project recommendations. *Ann Nutr Metab.* 2019.

KOLETZKO, B. et al. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum Dev*, 65 (Suppl:S3–S18), 2001.

KRUSE, M. et al. High-fat diet during mouse pregnancy and lactation targets gip-regulated metabolic pathways in adult male offspring. **Diabetes**, 2016.

LIANG, C.; OEST, M. E.; PRATER, M. R. Intrauterine Exposure to High Saturated Fat Diet Elevates Risk of Adult-Onset Chronic Diseases in C57BL / 6 Mice. 2009.

MA, S. Keto-Adaptation and Endurance Exercise Capacity, Fatigue Recovery, and Exercise-Induced Muscle and Organ Damage Prevention: A Narrative Review. 2019.

MARCHESI, J. R. et al. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. **Gut**, 2016.

MCCLURE, C. K. et al. Lactation and maternal subclinical cardiovascular disease among premenopausal women. **Am J Obstet Gynecol**, 2012.

MCKENZIE, A. L. et al. A Novel Intervention Including Individualized Nutritional Recommendations Reduces Hemoglobin A1c Level, Medication Use, and Weight in Type 2 Diabetes. **JMIR Diabetes**, 2017.

MENDES-DA-SILVA, C. et al. Maternal high-fat diet during pregnancy or lactation changes the somatic and neurological development of the offspring, 2013.

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**, 2015.

MURTAZA, N. et al. Analysis of the effects of dietary pattern on the oral microbiome of elite endurance athletes. **Nutrients**, 2019.

NEWELL, C. et al. Ketogenic diet modifies the gut microbiota in a murine model of autism spectrum disorder. **Molecular Autism**, 2016.

NEWTON, C. A.; RASKIN, P. Diabetic Ketoacidosis in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. **Archives of Internal Medicine**, 2004.

NYUYGEN, P. H. et al. Ingestão de micronutrientes entre mulheres em idade reprodutiva no Vietnã. **PLoS ONE**, 2014

OHSIEK, S.; WILLIAMS, M.; DEAN, A. Psychological factors influencing weight loss maintenance : An integrative literature review. 2011.

OLIVEIRA, C. DE. Maternal diet , bioactive molecules , and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. 2014.

OSTLUND, I.; HAGLUND, B.; HANSON, U. Gestacional diabetes and preeclampsia. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 2004.

PANTALEÃO, L. C. et al. Maternal postnatal high-fat diet, rather than gestational diet, affects morphology and mTOR pathway in skeletal muscle of weaning rat. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2013.

PAOLI, A. et al. Ketosis, ketogenic diet and food intake control: a complex relationship. **FRONTIERS IN PSYCHOLOGY**, 2015.

RAMAMURTHY, S.; RONNETT, G. V. Developing a head for energy sensing: AMP-activated protein kinase as a multifunctional metabolic sensor in the brain. **Journal of Physiology**, 2006.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FABEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of The American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. American Institute of Nutrition. 1993.

REHFELDT, C. et al. Limited and excess protein intake of pregnant gilts differently affects body composition and cellularity of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue of newborn and weanling piglets. **European Journal of Nutrition**, 2012.

RIBEIRO, L. C. et al. Ketogenic diet-fed rats have increased fat mass and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2008.

RODRÍGUEZ, J. M. et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microbial Ecology in Health & Disease**, 2015.

ROTHSCHILD, D. et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. **Nature**, 2018.

SHARMAN, M. J. et al. A Ketogenic Diet Favorably Affects Serum Biomarkers for Cardiovascular Disease in Normal-Weight Men. **The Journal of Nutrition**, 2002.

SILVA, A. K. et al. Low-carb diet in perinatal rats on sugar-sweetened beverage preference, food consumption and body weight in male offspring. **Brazilian Journal of Development**, 2022.

STATOVCI, D. et al. The impact of western diet and nutrients on the microbiota and immune response at mucosal interfaces. **Frontiers in Immunology**, 2017.

SWIFT, D. L. et al. PT US CR. **Progress in Cardiovascular Diseases**, p. #pagerange#, 2018.

TAGLIABUE, A.; ELLI, M. The role of gut microbiota in human obesity: Recent findings and future perspectives. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, 2013.

THOEN, L. F. R. et al. The Hippo pathway effector YAP controls mouse hepatic stellate cell activation. **Journal of Hepatology**, 2015.

TREMAROLI, V.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; BACKHED, F. A role for the gut microbiota in energy harvesting? Correspondence to Dr Fredrik Bäckhed, Wallenberg Laboratory, Sahlgrenska University Hospital, S-413 45 Göteborg, Sweden, 2010

TSCHIDERER, L. et al. Breastfeeding is associated with a reduced maternal cardiovascular risk: systematic review and meta-analysis involving data from 8 studies and 1 192 700 parous women. **J Am Heart Assoc**, 2022.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, 2006.

VARGAS, S. et al. Efficacy of ketogenic diet on body composition during resistance training in trained men : a randomized controlled trial. 2018.

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**, 2004.

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.

VOGT, M. C. et al. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. **Cell**, 2014.

VOLEK, J. S.; SHARMAN, M. J.; FORSYTHE, C. E. Recent advances in nutritional sciences modification of lipoproteins by very low-carbohydrate diets. **J Nutr**, 2005.

WAARD, M. et al. Optimal nutrition in lactating women and its effect on later health of offspring: A systematic review of current evidence and recommendations (EarlyNutrition project). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2016

WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. et al. Dietary Protein, Weight Loss, and Weight Maintenance. **Annual Review of Nutrition**, 2009.

WOLTERS, M. et al. Dietary fat, the gut microbiota, and metabolic health – A systematic review conducted within the MyNewGut project. **Clinical Nutrition**, 2019.

ZENG, M. Y.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunology**, 2017.

ZHANG, H. et al. Host adaptive immunity alters gut microbiota. **ISME Journal**, 2015.

ZHANG, M.; YANG, X. J. Effects of a high fat diet on intestinal microbiota and gastrointestinal diseases. **World Journal of Gastroenterology**, 2016.

ZOETENDAL, E. G. et al. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. **ISME Journal**, 2012.

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética Animal.



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50070-420 / Recife - PE - Brasil
 Fone: 2126-8842
 cma@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
Resolvidade	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

Atenciosamente



Prof. Sebastião R. F. Silva
 –Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691