

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA NA PROGRAMAÇÃO FETAL  
DO METABOLISMO ENERGÉTICO E ATIVIDADE DE ENZIMAS  
DIGESTIVAS EM RATOS**

CAROLYNE ASSIS EIGENHEER PINKE

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Zootecnia,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU - SP  
Agosto – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA NA PROGRAMAÇÃO FETAL  
DO METABOLISMO ENERGÉTICO E ATIVIDADE DE ENZIMAS  
DIGESTIVAS EM RATOS**

**CAROLYNE ASSIS EIGENHEER PINKE**  
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Antônio Celso Pezzato  
Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Rangel da Silva Sartori  
Co-orientadora: Dra. Daniela Felipe Pinheiro

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Zootecnia,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU - SP  
Agosto – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Pinke, Carolyne Assis Eigenheer.

Efeito da dieta hiperlipídica na programação fetal do metabolismo energético e atividade de enzimas digestivas em ratos / Carolyne Assis Eigenheer Pinke. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Antônio Celso Pezzato

Coorientador: Denise Rangel da Silva Sartori

Coorientador: Daniela Felipe Pinheiro

Capes: 50403001

1. Feto - Desenvolvimento. 2. Expressão gênica. 3. Nutrição animal - Aspectos genéticos. 4. Óleos e gordura na nutrição animal - Metabolismo.

Palavras-chave: Desenvolvimento animal; Enzimas intestinais e pancreáticas; Metabolismo de glicose; Metabolismo de lipídeos; Restrição nutricional materna.

*Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível  
e de repente você estará fazendo o impossível.*

*O que temer? Nada.*

*A quem temer? Ninguém.*

*Por que? Porque aqueles que se unem a Deus obtêm três grandes privilégios:  
Onipotência sem poder; embriaguez sem vinho e vida sem morte.*

*Onde há amor e sabedoria, não tem temor e nem ignorância.*

*São Francisco de Assis*

## *Dedico*

*A **Deus** que conduziu cada passo dado por mim, cada caminho escolhido e sempre esteve ao meu lado, possibilitando a realização deste trabalho. Toda a minha gratidão a Ele que permitiu que eu alcançasse esta vitória.*

*A cada um dos animais que fizeram parte deste trabalho, pois sem cada um deles não teria sido possível a sua realização.*

*A minhas avós **Neusa** (homenagem póstuma) e **Romilda**.*

## *Ofereço*

*Aos meus pais **Cássia e Ernesto** que me deram muito amor, carinho, um lar cheio de felicidade e que me ensinaram a ser uma pessoa de bem e perseguidora dos meus sonhos. Que sempre se esforçaram para me dar uma educação formal de qualidade, desde o início da minha vida de estudante e que sempre me apoiaram em todas as minhas idéias, perspectivas e sonhos.*

*Aos meus irmãos, **Henrique e Rachel**, pois sem eles não teria aprendido a dividir, a querer bem ao outro, a compartilhar segredos, a apoiar em todos os momentos e ter uma infância e uma juventude alegre, além de chegar à idade adulta tendo os melhores amigos que eu poderia ter.*

*Ao meu companheiro **Marcos** por sempre me apoiar nas minhas decisões, estar a meu lado nos momentos mais felizes e nos mais difíceis, por me dar amor e me proporcionar a aprender a viver com ele, compartilhar de sonhos e aspirações. Por sua paciência e apoio a decidir mudar os meus caminhos e procurar por aprimorar meus conhecimentos.*

*A todos os meus familiares e amigos que acompanharam a minha jornada até aqui.*

## ***Agradecimento Especial***

***À profa. Denise Rangel da Silva Sartori***

*Agradeço por toda a confiança depositada em mim e ter me dado a oportunidade de realizarmos este trabalho. Por tudo que me ensinou durante esses anos e por ter sido mais do que professora e orientadora, mas também incentivadora e amiga.*

*Meu sincero agradecimento.*

***À Daniela Felipe Pinheiro***

*Agradeço por acreditar em mim, a ajudar a proporcionar a realização deste trabalho, se disponibilizar em todos os momentos, mesmo com todas as dificuldades que teve durante estes anos, por sua amizade e valiosas contribuições.*

*Muito obrigada!*

***À profa. Maria de Lourdes Mendes Vicentini-Paulino***

*Agradeço pela confiança depositada em mim, abertura de seu laboratório o que possibilitou realizar todos os sacrifícios e análises deste trabalho, por sua ajuda, paciência, conhecimento e valiosas contribuições na elaboração, condução e finalização deste trabalho. Por sua amizade e ensinamentos.*

*Muito obrigada!*

## ***Agradecimentos***

*À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ UNESP-Botucatu pela minha formação profissional e por todo o conhecimento e infraestrutura para realização das atividades de pesquisa.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ UNESP-Botucatu pela oportunidade da realização deste curso.*

*Ao Departamento de Fisiologia-IBB/UNESP-Botucatu por toda a infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.*

*À CAPES pela bolsa fornecida durante a maior parte do período do mestrado, o que sem ela não seria possível concluir o curso.*

*À FAPESP pelo auxílio fornecido pois sem ele a realização deste trabalho não teria sido possível.*

*À servidora do departamento de Fisiologia-IBB/UNESP-Botucatu, **Lílian Morceli**, por toda a sua ajuda na execução dos trabalhos desde a sua implantação, nos sacrifícios dos animais, na execução de diversas análises, por todas as suas contribuições no desenvolvimento e busca por explicações aos resultados encontrados, por toda a sua amizade nos meus momentos de angústia, aflições e tudo mais em que me ajudou.*

*Obrigada pela sua hospitalidade e recepção nos momentos que necessitei para finalização dos trabalhos. Agradeço muito por ter te conhecido e você ter oferecido a sua amizade.*

*Muito obrigada, Lili!*

*Ao prof. **Antônio Celso Pezzato** que no momento de dificuldade aceitou se tornar meu orientador sem ao menos saber ao certo do que se tratava o meu trabalho e por suas valiosas contribuições com a formulação, produção e análises das rações.*

*Aos servidores do departamento de Fisiologia-IBB/UNESP-Botucatu, **Hélio e Tardivo** por toda a sua ajuda em todas as fases do experimento e análises, me auxiliando em todos os momentos de dificuldades e que necessitei de ajuda para a execução dos trabalhos.*

*Ao prof. **José Buratini Júnior** pela abertura do seu laboratório e disponibilidade para a realização das análises biomolecular*

*À **Mariana Fernandes Machado** por todo conhecimento e auxílio desde a elaboração do projeto até o final das análises de PCR e por sua amizade.*

*Ao prof. **Luiz Edivaldo Pezzato** por toda a sua orientação, paciência e abertura para discussão de diversos assuntos relacionados à produção das rações utilizadas.*

*Ao dr. **Haroldo Garcia de Faria** por suas contribuições na formulação e preparo das rações e por toda a sua disponibilidade em ajudar na discussão dos mesmos.*

*Ao prof. **Alessandro Francisco Talamini do Amarante** pela abertura do seu laboratório no departamento de parasitologia-IBB/UNESP-Botucatu para as análises parasitológicas dos animais.*

*Aos servidores do departamento de parasitologia-IBB/UNESP-Botucatu **Roberto, Valdir e Alessandra** pela ajuda e explicações nos exames parasitológicos.*

À **Renata Capela** do laboratório experimental de clínica médica-FMB/UNESP-Botucatu pelo auxílio nas análises bioquímicas.

Ao **Sílvio**, do setor de fotografia da UNESP de Botucatu, pelas fotos feitas, que ilustraram muito bem o meu trabalho

À **Maria Márcia Pereira Sartori** pela análise estatística dos dados obtidos e pela ajuda na interpretação destes.

À **Fernanda Panegossi**, estagiária do laboratório, que me auxiliou em todo o período de projeto, além de ter tido toda a paciência comigo nos meus momentos de angústia, ansiedade.

Ao **Thiago Shigueo Teruya** pelo auxílio nos sacrifícios e na determinação de gordura total, gordura hepática e glicogênio hepático, além da ajuda em todos os trabalhos do laboratório.

Ao **Ângelo Thompson Colombo Lo** pelo auxílio na determinação de gordura total, gordura hepática e glicogênio hepático, além da ajuda em todos os trabalhos do laboratório.

À **Melissa de Souza Emerson**, por todas as vezes que acordou cedo para me ajudar no biotério nos finais de semana, pela sua amizade, companheirismo e conversas longas.

À **Mayara Rodriguez, Carolina Carvalho de Miranda, Édina Aguiar, Fernando Bezerra e Lucas Alesi C. Mendonça** nos dias de sacrifício.

À **Jacqueline Xavier** que me auxiliou no biotério no final de semana que veio à Botucatu passear e rever os amigos

À **König do Brasil** pelo fornecimento dos anti helmínticos utilizados nos animais.

Ao **prof. Ciro** do departamento de farmacologia pela abertura do seu laboratório nos momentos de necessidade e pela disponibilidade do uso da autoclave.

À **Ana** do laboratório do prof. Di Stasi, departamento de farmacologia, pelo fornecimento dos endógenos para uso no RT-PCR das minhas amostras.

Aos **prof. Dirlei Antônio Berto, Ana Sílvia Alves Meira Tavares Moura, Haroldo Garcia de Faria e Ricardo de Oliveira Orsi** por suas valiosas contribuições.

À todas as meninas (**Ana Carolina, Beatriz, Fernanda, Maria Fernanda, Marília, Miriam e Patrícia**) que neste tempo todo viajaram comigo e tiveram a paciência de me escutar nos momentos de angústia e ansiedade.

Às meninas da república Dejavu (**Marília Pizzeta, Evelynne Leão e Gabriela Santa Rosa**) pela hospitalidade e recepção nos momentos em que precisei de um lugar para ficar em Botucatu para concluir os trabalhos quando já não mais morava na cidade.

*SUMÁRIO***CAPÍTULO I**

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....     | 02 |
| Referências Bibliográficas..... | 10 |

**CAPÍTULO II**

|                         |    |
|-------------------------|----|
| TÍTULO TRABALHO.....    | 16 |
| Resumo.....             | 17 |
| Abstract.....           | 18 |
| Introdução.....         | 19 |
| Material e Métodos..... | 20 |
| Resultados.....         | 27 |
| Discussão.....          | 39 |
| Referências.....        | 47 |

**CAPÍTULO III**

|                         |    |
|-------------------------|----|
| TÍTULO TRABALHO.....    | 54 |
| Resumo.....             | 55 |
| Abstract.....           | 56 |
| Introdução.....         | 57 |
| Material e Métodos..... | 58 |
| Resultados.....         | 62 |
| Discussão.....          | 65 |
| Referências.....        | 70 |

**CAPÍTULO IV**

|                  |    |
|------------------|----|
| IMPLICAÇÕES..... | 77 |
|------------------|----|

## LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO II

|                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composição das rações controle e hiperlipídica.....                                                                                                                                                                        | 23 |
| <b>Tabela 2.</b> Valores de análise bromatológica das rações controle e hiperlipídica.....                                                                                                                                                  | 23 |
| <b>Tabela 3.</b> Sequências, condições de corrida e tamanhos dos fragmentos de primers utilizados para PCR em tempo real (RT-PCR).....                                                                                                      | 26 |
| <b>Tabela 4.</b> Ingestão alimentar total (IA), energia ingerida (EI) de ratas-mãe nos períodos de gestação e lactação.....                                                                                                                 | 27 |
| <b>Tabela 5.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão do peso corpóreo, ganho de peso e peso de carcaça em animais de três semanas de idade.....                                                                                  | 29 |
| <b>Tabela 6.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão do peso dos depósitos de gordura, índice de adiposidade e teor de gordura hepática (%) e de carcaça (%) em animais de três semanas de idade.....                            | 29 |
| <b>Tabela 7.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão do perfil lipídico e glicose séricos em animais com três semanas de idade.....                                                                                              | 30 |
| <b>Tabela 8.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão do peso dos órgãos do trato gastrointestinal em animais com três semanas de idade.....                                                                                      | 30 |
| <b>Tabela 9.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão do peso corpóreo (g), peso de carcaça (g) e ganho de peso (g) em animais da 3 <sup>a</sup> a 16 <sup>a</sup> semana de idade.....                                           | 32 |
| <b>Tabela 10.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão da ingestão alimentar (IA), energia ingerida (EI) e conversão alimentar (CA) em animais da 3 <sup>a</sup> a 16 <sup>a</sup> semana de idade.....                           | 33 |
| <b>Tabela 11.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão do peso dos depósitos de gordura (%), teor de gordura de carcaça (%), índice de adiposidade, índice de Lee e comprimento naso-anal em animais com 16 semanas de idade..... | 35 |
| <b>Tabela 12.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão do teor de gordura hepática (%) e glicogênio hepático (%) em animais com 16 semanas de idade.....                                                                          | 36 |
| <b>Tabela 13.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão da área total abaixo da curva glicêmica (AUC), perfil lipídico e glicose séricos em animais com 16 semanas de idade...                                                     | 37 |

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 14.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão do peso dos órgãos do trato gastrointestinal (%) e músculo sóleo (%) em animais com 16 semanas de idade..... | 40 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### CAPÍTULO III

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composição das rações controle e hiperlipídica.....                                                                                                    | 61 |
| <b>Tabela 2.</b> Valores de análise bromatológica das rações controle e hiperlipídica.....                                                                              | 62 |
| <b>Tabela 3.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão da atividade das enzimas intestinais (unidades/mg de mucosa) em animais com três semanas de idade.....  | 63 |
| <b>Tabela 4.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão da atividade das enzimas pancreáticas (unidades/mg de mucosa) em animais com três semanas de idade..... | 63 |
| <b>Tabela 5.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão da atividade das enzimas intestinais (unidades/mg de mucosa) em animais com 16 semanas de idade.....    | 64 |
| <b>Tabela 6.</b> Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão da atividade das enzimas pancreáticas (unidades/mg de mucosa) em animais com 16 semanas de idade.....   | 66 |

## LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO I

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Períodos críticos da gestação no desenvolvimento do metabolismo fetal..... | 04 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## CAPÍTULO II

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Evolução do peso corporal (g) das ratas-mãe do dia 1 ao 21 do período gestacional (A) e lactacional (B)..... | 28 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 2.</b> Teste de Tolerância à glicose de grupo de ratos de 16 semanas de idade que não sofreram restrição alimentar materna na gestação e lactação e receberam dieta controle (CCC) ou dieta hiperlipídica (CCH) pós-desmame (A); grupo de ratos de 16 semanas que sofreram restrição materna de 30% somente na gestação e receberam dieta controle (RCC) ou a dieta hiperlipídica (RCH) pós-desmame (B); grupo de ratos que sofreram restrição alimentar materna de 30% na gestação e na lactação e receberam dieta controle (RRC) ou hiperlipídica (RRH) após o desmame (C). Área total abaixo da curva glicêmica (AUC) de todos os grupos experimentais (D)..... | 38 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 3.</b> Abundância de RNAm do GLUT4 no tecido adiposo periepididimal (A) e no músculo sóleo (B) em ratos com 16 semanas de idade filhos de mães que receberam alimentação <i>ad libitum</i> na gestação e lactação e que após o desmame receberam dieta controle (CCC) ou dieta hipercalórica (CCH); filhos de mães que receberam alimentação <i>ad libitum</i> na gestação e foram restritas na lactação e que após o desmame receberam dieta controle (RCC) ou dieta hipercalórica (RCH); e filhos de mães que receberam alimentação <i>ad libitum</i> na gestação e lactação e que após o desmame receberam dieta controle (RRC) ou dieta hipercalórica (RRH)..... | 41 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

# **Capítulo I**

## **Considerações Iniciais**

### **Considerações Iniciais**

A obesidade tem sido considerada uma desordem metabólica causada pelo excessivo ganho de peso com estoque de gordura devido ao desbalanceamento nutricional entre energia ingerida e gasta (PAULA e ROSEN, 2010). Atualmente, a obesidade é uma grande preocupação em todo o mundo ocidental, tanto para a espécie humana quanto para outras espécies animais como cães e gatos (PEREIRA et al., 2003; HALPERN et al., 2004; BATISTELLA e DOMINGUES, 2005; LIMA, 2005; VEIGA, 2005; PINKE, 2008).

O desenvolvimento da obesidade tem vários fatores envolvidos e é considerada uma doença multifatorial (HALPERN et al., 2004), sendo que a combinação desses fatores favorece o seu aparecimento. Esses fatores podem ser genéticos, endócrinos e ambientais, como dieta, sedentarismo, fatores sociais, farmacológicos, entre outros (SAHU, 2004; LIMA, 2005; VEIGA, 2005).

Estudos em humanos têm mostrado que a alimentação inadequada da mãe durante a gestação pode levar ao aparecimento da obesidade (VICKERS et al., 2000), da síndrome metabólica (VARVARIGOU, 2010; NÜSKEN et al., 2011), diabetes mellitus tipo II (MARTINS, 2010), hipertensão (McMILLEN e ROBINSON, 2005) e doenças cardiovasculares (GODFREY e BARKER, 2001; VELKOSKA et al., 2008) no início da vida adulta da prole.

Além disso, há também evidências, em humanos, que a restrição de alimentos na gestação aumenta o risco de neoplasias, insuficiência renal crônica, osteoporose, hipotireoidismo autoimune, asma na idade adulta, hipertrofia cardíaca, depressão, tumor de testículo, cirrose hepática, esquizofrenia, dificuldade auditiva no adulto, síndrome do ovário policístico, maior dificuldade de aprendizagem e menor capacidade profissional (MARTINS, 2010).

Considerando que grande parte do desenvolvimento do sistema regulador do balanço energético ocorre no período perinatal, condições desfavoráveis nesta fase de desenvolvimento podem reprogramar o metabolismo, ajustando-o nesta condições, perpetuando-se ao longo de sua vida (REMMERS e DELEMARRE-VAN DE WALL, 2011).

O conceito de que existe uma resposta adaptativa, em fetos, a um ambiente intrauterino adverso é consistente com a definição de “programação” proposta por Lucas

(1991). Para explicar essa programação Hales e Barker, em 1992, propuseram a hipótese do “fenótipo econômico”, sugerindo que o desenvolvimento fetal é sensível ao ambiente nutricional. Assim, essa programação aumentaria as chances de sobrevivência do feto sob condições de nutrição precárias e intermitentes e resultaria num metabolismo pós-natal alterado (GOTTLIEB et al., 2008). Entretanto, se após a deficiência ou falta de nutrientes ocorrida nos períodos gestacional e/ou lactacional houver maior disponibilidade de nutrientes, o indivíduo poderá apresentar risco aumentado de surgimento de doenças metabólicas e cardiovasculares na vida adulta (DRAKE e WALKER, 2004; McMILLEN e ROBINSON, 2005; McARDLE et al., 2006; BARKER, 2007; LEANDRO et al., 2009).

Um outro importante conceito é o de que dependendo da fase gestacional em que condições adversas ocorrem no ambiente intrauterino, o indivíduo pode ficar propenso a desenvolver uma ou outra doença decorrente desta condição (Figura 1). No caso, segundo Rinaudo e Wang (2012), se houver prejuízo no início da gestação, o feto terá maior predisposição ao desenvolvimento de doenças coronarianas, na fase intermediária do desenvolvimento fetal, maior risco de problemas renais e, no final da gestação, o indivíduo estará mais propenso a apresentar baixo peso ao nascer e alterações no seu metabolismo intermediário que o levará ao desenvolvimento da obesidade e doenças relacionadas. Além do mais, a restrição de nutrientes desde o período da pré-implantação do embrião até o seu nascimento pode desencadear intolerância à glicose na vida adulta (RINAUDO e WANG, 2012).

Além disso, em animais com gestação múltipla, a distribuição dos nutrientes pela placenta se dá de forma diferenciada entre os fetos. Filhotes que nascem mais leves refletem menor fornecimento de nutrientes pela placenta, o que está relacionado com a distribuição dos fetos dentro do útero, e podem apresentar fenótipos diferentes quando adultos (DESAI et al., 2007; NISSEN et al., 2011).

Tais respostas adaptativas no metabolismo podem ser programadas por meio de mecanismos epigenéticos em decorrência de mudanças no meio fetal (GICQUEL et al., 2008; JONES e OZANNE, 2009). De fato, a habilidade que o organismo tem em alterar o seu desenvolvimento dependendo do ambiente requer regulação da expressão gênica estável mediada pelo processo epigenético, envolvendo metilação do DNA e modificação das histonas. Desta forma, tanto o genoma quanto o epigenoma podem influenciar o

fenótipo favorecendo a plasticidade, considerada um paradigma da interação entre genes e ambiente (LANHAM et al., 2010).

A programação fetal pode ser obtida por dois modelos: insuficiência placentária com a ligação da artéria uterina ou manipulação dietética (restrição calórica global, restrição protéica, restrição de micronutrientes ou dieta hiperlipídica) (ARMITAGE et al., 2004; NÜSKEN et al., 2011, RAO et al., 2012). Quando é realizada a ligação da artéria uterina, em ratos, acontece a programação da resistência à insulina, resistência à leptina, aumento dos triglicerídeos circulantes e da adiposidade global no início da vida adulta em até 10 semanas de idade. Em contrapartida, quando a programação acontece devido à manipulação dietética, esses eventos acontecem mais tarde nos animais, com exceção da hipertensão arterial que aparece mais cedo em animais submetidos à restrição alimentar do que aqueles expostos à insuficiência placentária (NÜSKEN et al., 2011).

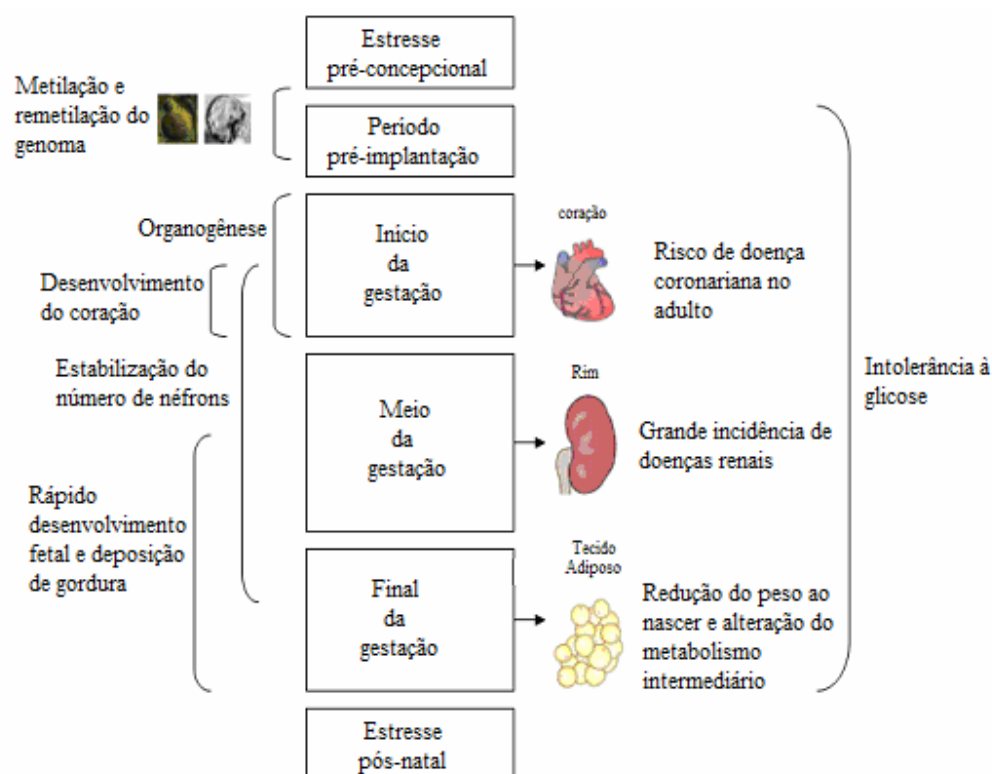


**Figura 1.** Períodos críticos da gestação no desenvolvimento do metabolismo fetal (Adaptado de RINAUDO e WANG, 2012).

A restrição nutricional durante a vida intrauterina acarreta em prejuízos na regulação neuroendócrina, provocando hiperinsulinemia e hiperleptinemia após o nascimento, com o aparecimento de resistência a esses dois hormônios (VICKERS et al., 2000).

Em roedores, a restrição calórica na vida fetal provoca redução do peso ao nascer (ARMITAGE et al., 2004). No entanto, os efeitos da restrição protéica intrauterina sobre o peso ao nascimento são divergentes; alguns pesquisadores encontraram redução do peso (BARKER et al., 1993; OZZANE et al., 2000), enquanto outros não observaram alteração significativa (SILVEIRA, 2010).

Além da influência da nutrição no desenvolvimento durante a vida intrauterina, estudos têm demonstrado a importância da nutrição após o nascimento, apresentando um papel fundamental na saúde do animal na vida adulta. É no início da vida após nascimento que acontecem os eventos de plasticidade fisiológica (BUCKLEY et al., 2005). Assim, os efeitos da restrição nutricional intrauterina podem ser minimizados quando a alimentação materna é desbalanceada durante a gestação e torna-se equilibrada durante a lactação. No entanto, se alimentação durante a lactação ainda for desbalanceada, seja ela com restrição de nutrientes ou dieta hipercalórica, esta situação poderá amplificar as alterações provocadas durante o desenvolvimento fetal (BUCKLEY et al., 2005).

As consequências provocadas por uma alimentação com dieta hiperlipídica já estão bem estabelecidas nas funções cardiovasculares (ASCHERIO, 2002), sendo que a disfunção endotelial é mais severa em animais provenientes de mães que receberam dieta hiperlipídica na lactação (KHAN et al., 2005). Há estudos que relatam os efeitos da restrição materna associadas à dieta hipercalórica pós-natal, sugerindo que esta condição nutricional expõe a prole ao desenvolvimento da obesidade na vida adulta (VICKERS et al., 2000; VICKERS et al., 2001; VICKERS et al., 2003). Assim, uma dieta hipercalórica no início da vida pós-natal pode resultar em aumento do peso corporal ao desmame, pois mudanças nutricionais em idade prematura podem afetar a regulação do apetite, alterando a resposta da insulina e da leptina, hormônios importantes para proporcionar o desenvolvimento dos circuitos hipotalâmicos ligados à regulação da ingestão alimentar (VICKERS et al., 2000; VELKOSKA et al., 2008).

O apetite e o balanço energético são regulados por um complexo circuito neural no hipotálamo que recebe sinais nutricionais, hormonais e neurais provenientes de tecidos periféricos como adipócitos, pâncreas e do trato gastrointestinal. Essa sinalização age em regiões específicas do hipotálamo ativando os neuropeptídeos reguladores da ingestão alimentar: os neuropeptídeos orexigênicos, o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada à agouti (AGRP), e os neuropeptídeos anorexigênicos, a proopiomelanocortina (POMC) e o transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (CART) (McMILLEN e ROBINSON, 2005). Assim, o hipotálamo fetal pode ser um importante local de transição das mudanças no estado endócrino pré-natal desencadeando a programação (GODFREY e BARKER, 2001).

A insulina e a leptina estão envolvidas na regulação do apetite, do balanço energético e, conseqüentemente, do peso corporal. A insulina atua inibindo a ação de NPY e AGRP e estimulando POMC e CART no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), assim reduzindo a ingestão alimentar. A leptina age da mesma forma que a insulina, reduzindo a ingestão alimentar (SCHWARTZ et al., 2000; WOODS et al., 2004; PINKE, 2008). Embora estes hormônios atuem simultaneamente no hipotálamo, a insulina é o primeiro hormônio a agir na redução da ingestão; além disso, ela também promove o estoque de gordura corporal, que irá aumentar a secreção de leptina, assim potencializando a sinalização no hipotálamo, com conseqüente redução da ingestão de alimentos (SCHWARTZ et al., 2000; BENOIT et al., 2004).

A desnutrição materna também pode provocar alterações no tipo de fibra muscular esquelética e essas alterações na morfologia muscular podem ter uma importante influência no desenvolvimento da resistência à insulina (LEANDRO et al., 2012).

Estudos mostram que a desnutrição fetal reduz as fibras musculares sensíveis à insulina, provocando diminuição do tecido muscular esquelético e aumentando o tecido adiposo, com baixos níveis da proteína transportadora de glicose, GLUT4, em ambos os tecidos (SEVILLA et al., 1997; MARTINS, 2010). Além disso, a restrição alimentar durante a gestação ou imediatamente após o nascimento promove redução da massa muscular esquelética (McMILLEN e ROBINSON, 2005), que parece estar relacionada com mudanças na expressão de genes associados ao processo de crescimento muscular (BAYOL et al., 2004; GICQUEL et al., 2008).

O GLUT4, um membro da família de transportadores de glicose expresso no músculo esquelético, cardíaco e tecido adiposo (BELL et al., 1990; STENBIT et al., 1999), tem papel crítico no transporte de glicose nestes tecidos, uma vez que este transporte ocorre quando a insulina estimula a translocação de GLUT4 do meio intracelular à membrana celular (SHEPHERD e KAHN, 1999). Vários fatores hormonais e metabólicos regulam a expressão do GLUT4. A restrição de nutrientes na vida intrauterina e fase adulta aumentam a expressão do gene GLUT4 no músculo esquelético, aumentando desta forma a sensibilidade à insulina (DEAN e CARTEE, 2000; DeFREITAS et al., 2003). Por outro lado, no desenvolvimento do diabetes mellitus tipo II há uma redução na expressão do transportador GLUT4 e de proteínas importantes na sinalização de ação da insulina no músculo esquelético (MARTINS, 2010), que têm sido associadas com a resistência à insulina (JAMES et al., 1989; MAIANU et al., 2001; PETERSIDE et al., 2003). No tecido adiposo epididimal de camundongos, a expressão do GLUT4 encontra-se aumentada na fase de desenvolvimento da obesidade, mas sofre redução posterior, favorecendo o aparecimento da resistência à insulina (PAPA et al., 2002).

O quadro de resistência aos hormônios insulina e leptina desencadeados pela programação fetal pode induzir a situações de hiperfagia, obesidade e hipertensão na vida adulta (VICKERS et al., 2000; VICKERS et al., 2003). A hiperfagia pós-desmame pode ser programada durante a vida fetal por desnutrição materna assim como durante o período de amamentação com aumento da ingestão de leite (BAYOL et al., 2007). Coelhos adultos, provenientes de mães alimentadas com dietas hiperlipídicas no período gestacional, apresentaram aumento da ingestão alimentar e do peso corpóreo (PICONE et al., 2011).

Alterações no metabolismo hepático da glicose, assim como mudanças no metabolismo do colesterol, na resistência à insulina e no desenvolvimento renal foram observadas em ratos cujas mães receberam dietas com baixa proteína ou energia durante a gestação (GODFREY e BARKER, 2001).

A desnutrição no período gestacional, além de restringir o crescimento intrauterino altera a circulação fetal, que passa a ser orientada para o sistema nervoso central. Desta forma, afeta o crescimento do fígado e, consequentemente, provoca distúrbios no metabolismo lipídico e de glicose, com alterações permanentes em duas enzimas hepáticas: a fosfoenolpiruvato carboxilase e a glicoquinase, ambas envolvidas na síntese e quebra da

glicose (BARKER, 1998). Essa redistribuição do fluxo sanguíneo intrauterino também pode prejudicar outros órgãos do trato gastrointestinal, alterando a composição destes e a secreção de hormônios que atuam no crescimento fetal (GURMINI et al., 2005).

Em ratos, a desnutrição durante a gestação e lactação provocou aumento do colesterol de alta densidade (HDL-colesterol), do colesterol total e de lipídeos totais. Reduziu os triglicerídeos plasmáticos bem como levou ao acúmulo de triglicerídeo hepático, explicado pela síntese reduzida de apolipoproteína hepática que forma a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), responsável pelo transporte de triglicerídeos no plasma (BERLEZE, 2005). Além disso, aumento de gordura retroperitoneal e perigonadal foi observado em animais nascidos de mães que sofreram restrição calórica ou protéica durante a gestação (ARMITAGE et al., 2004).

Além de alterações metabólicas, a restrição de nutrientes durante a gestação pode provocar alterações no trato gastrointestinal, tanto na morfologia dos órgãos como na atividade das enzimas digestivas (GURMINI et al., 2005; TIMOFEEVA et al., 2008).

Prole de fêmeas que sofreram desnutrição durante a gestação podem apresentar modificações morfológicas da mucosa intestinal com redução da superfície de absorção intestinal devido a menor quantidade de vilosidades que se apresentam mais curtas e largas (TAKANO, 1964; SHRADER e ZEMAN, 1969). Também podem causar diminuição do conteúdo de DNA, do comprimento do intestino delgado e menor taxa de migração dos enterócitos ao longo das vilosidades (GUTIÉRREZ et al., 1988; GURMINI et al., 2005).

As atividades de enzimas digestivas também podem ser modificadas, não só no início da ontogênese, mas também durante a vida adulta (TIMOFEEVA et al., 2008). De fato, em animais submetidos à restrição alimentar intrauterina, foram observadas alterações na atividade enzimática e na absorção de carboidratos, lipídeos e proteínas, que podem estar associadas à alta mortalidade perinatal ou na recuperação do crescimento pós-natal em animais de baixo peso ao nascer (SHRADER e ZEMAN, 1969; TIMOFEEVA et al., 2008).

Os estudos com desnutrição materna apontam para diversas alterações metabólicas e cardiovasculares que contribuem para o surgimento de patologias como a obesidade, hipertensão e diabetes tipo II na vida adulta. Além disso, a restrição de nutrientes durante o período gestacional associada a dietas de alta energia podem estar relacionadas com o desenvolvimento de diversas outras doenças no início da vida adulta, bem como podem

provocar modificações no metabolismo do indivíduo, acarretando no surgimento de resistência à insulina, alterações no metabolismo lipídico e atividades de enzimas digestivas. Entretanto, ainda são poucos os relatos existentes sobre esse assunto, necessitando de mais estudos correlacionando a restrição de nutrientes durante o período de formação do indivíduo e a ingestão de dieta hipercalórica após o desmame como fatores desencadeantes de modificações metabólicas.

O Capítulo II denominado “Restrição nutricional materna associada à dieta hiperlipídica pós-desmame e seu efeito no desenvolvimento e metabolismo de ratos adultos” apresenta-se de acordo com as normas para publicação no **Brazilian Journal of Biology**. O objetivo deste trabalho foi avaliar a interferência da desnutrição materna durante o período da gestação e lactação, associada à ingestão de dieta de alto teor de lipídeos após o desmame no desenvolvimento corpóreo, metabolismo lipídico e de glicose sérica em animais com três e 16 semanas.

O Capítulo III intitulado como “Restrição alimentar materna e dieta hiperlipídica após desmame na atividade das enzimas digestivas de ratos” apresenta-se de acordo com as normas para publicação no **Brazilian Journal of Biology**. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar o efeito da ingestão de dieta com alto teor de lipídeos associada à desnutrição materna durante o período gestacional e lactacional na atividade das enzimas do trato gastrointestinal em animais com três e 16 semanas.

### Referências Bibliográficas

- ARMITAGE, J.A.; et al. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: How strong is the evidence from experimental models in mammals. **Journal of Physiology**, p.355-377, 2004.
- ASCHERIO, A. Epidemiologic studies on dietary fats and coronary heart disease. **Am. J. Med.**, v. 113 (Suppl 9B), p. 9S–12S, 2002.
- BARKER, D.J.P.; et al. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidemia (syndrome x): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia**, v.36, n.1, p.62-67, 1993.
- BARKER, D.J.P. In utero programming of chronic disease. **Clinical Science**, v.95, p.115-128, 1998.
- BARKER, D.J.P. The origins of the developmental origins theory. **J. Intern. Med.**, v.261, p.412-7, 2007.
- BATISTELLA, C.M.; DOMINGUES, J.L. Aspectos nutricionais e de manejo da obesidade em cães. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n.3, p.201-205, 2005. Acessado em 08 mar. 2008. Disponível em:  
<[http://www.nutritime.com.br/Consultas2/022V2N3P201\\_205\\_MAI2005.pdf](http://www.nutritime.com.br/Consultas2/022V2N3P201_205_MAI2005.pdf)>.
- BAYOL, S.; et al. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. **Br. J. Nutr.** v.91, p.331-339, 2004.
- 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**, v.98, p.843–851, 2007.
- BELL, G.I.; et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care**, v.13, p.198–208, 1990.
- BENOIT, S.C.; et al. Insulin and leptin as adiposity signals. **Recent Progress in Hormone Research**, v.59, p.267-285, 2004. Acessado em 08 jul. 2008. Disponível em:  
<<http://rphr.endojournals.org/cgi/reprint/59/1/267.pdf>>.
- BERLEZE, K.J. **Efeitos de diferentes dietas sobre o metabolismo de lipídeos e de carboidratos em ratas normonutridas e desnutridas**. 2005. 104f. Dissertação

- (Mestrado em Ciências Biológicas-Bioquímica/Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.
- BUCKLEY, A.J.; JAQUIERY, A.L.; HARDING, J.E. Nutritional programming of adult disease. **Cell Tissue Res.**, v. 322, p. 73-79, 2005.
- DEAN, D.J.; CARTEE, G.D. Calorie restriction increases insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 in rat skeletal muscle. **Acta Physiol Scand**, v.169, p.133–139, 2000.
- DeFREITAS, M.S.; et al. Up-regulation of phosphatidylinositol-3-kinase and glucose transporter 4 in muscle of rats subjected to maternal undernutrition. **Biochim Biophys Acta**, v.1639, p.8–16, 2003.
- DESAI, M.; et al. The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 196, p.555e1-555e7, 2007.
- DRAKE, A.J.; WALKER, B.R. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. **J. Endocrinol**, v.180, p.1–16, 2004.
- GICQUEL, C.; EL-OSTA, A.; Le BOUC, Y. Epigenetic regulation and fetal programming. **Best practice & research. Clin Endocrinol Metabolism**, v.22, n.1, p.1-16, 2008.
- GODFREY, K.M.; BARKER, D.J.P. Fetal programming and adult health. **Public Health Nutrition**, v.4, n.2B, p.611±624, 2001.
- GOTTLIEB, M.G.V.; da CRUZ, I.B.M.; BODANESE, L.C. Origem da síndrome metabólica: aspectos genético-evolutivos e nutricionais. **Scientia Medica**, v.18, n.1, p.31-38, 2008.
- GURMINI, J.; et al. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após lactação. **J. Brás. Patol. Méd. Lab.**, v. 41, n. 4, p. 271-8, 2005.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. Efectos de la malnutrición in útero y em la lactancia sobre diversos parámetros del intestino delgado de rata. **Rev. Esp. Fisiol.**, v. 44, n. 4, p. 413-21, 1988.
- HALES, C.N.; BARKER, D.J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v.35, n.7, p. 595–601, 1992.

- HALPERN, Z.S.C.; RODRIGUES, M.D.B.; da COSTA, R.F. Determinantes fisiológicos do controle de peso e apetite. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.31, n.4, p.150-153, 2004.
- JAMES, D.E.; STRUBE, M.; MUECKLER, M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. **Nature**, v.338, p.83–87, 1989.
- JONES, R.H; OZANNE, S.E.F. Fetal programming of glucose-insulin metabolism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.297, p.4-9, 2009.
- KHAN, I.Y.; et al. A high fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **Am. J. Physiol.**, v. 288, p. R127-R133, 2005.
- LANHAM, S.A.; et al. Maternal high-fat diet: effects on offspring bone structure. **Osteoporos Int**, v.21, p.1703–1714, 2010.
- LEANDRO, C.G.; et al. Pode a atividade física materna modular a programação fetal induzida pela nutrição? **Rev. Nutr.**, v.22, p.559-569, 2009.
- LEANDRO C.G.; et al. Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. **Eur. J. Nutr.**, v. 51, n. 7, p. 807-15, 2012.
- LIMA, R.M. Obesidade: o mal do século. **Revista Perspectivas**, Campos do Goytacazes/RJ, v.4, n.8, p.86-99, 2005.
- LUCAS, A. Programming in early nutrition in man. **Ciba Foun Symp**, v. 156, p. 38-53, 1991.
- MAIANU, L.; KELLER, S.R.; GARVEY, W.T. Adipocytes exhibit abnormal subcellular distribution and translocation of vesicles containing glucose transporter 4 and insulin regulated amino-peptidase in type 2 diabetes mellitus: implications regarding defects in vesicle trafficking. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, p. 5450–5456, 2001.
- MARTINS, R.M.A. **Origens fetais de doenças do adulto** – revisão etiopatogênica da doença mais investigada: diabetes mellitus tipo II. 2009. 34p. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Universidade do Porto, Portugal. 2010.
- McARDLE, H.J., ANDERSEN, H.S.; AMBLING, L. Fetal programming: causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats – a review. **Placenta**, v.27, p.56-60, 2006.

- McMILLEN, C.; ROBINSON, J.S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity and programming. **Physiology Reviews**, v.85, p.571-633, 2005.
- NISSEN, P.M.; et al. Metabolomics reveals relationship between plasma inositols and birth weight: possible markers for fetal programming of type 2 diabetes. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, vol/is.2011/1110-7243, p.1110-7251, 2011.
- NÜSKEN, K.D.; et al. Fetal programming of gene expression in growth-restricted rats depends on the cause of low birth weight. **Endocrinology**, v.152, p.1327-1335, 2011.
- OZZANE, S.E.; et al. Depot-specific effects of early growth retardation on adiposity insulin action. **Horm. Metab. Res.** v.32, p.71-75, 2000.
- PAPA, P.C.; VARGAS, A.M.; SILVA, J.L.T.; NUNES, M.T.; MACHADO, U.F. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Sciences**, v.71, p. 1917–1928, 2002.
- PAULA, F.J.A.; ROSEN, C.J. Obesity, diabetes mellitus and last but not least, osteoporosis. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.54, n.2, p.150-157, 2010.
- PEREIRA, L.O.; de FRACISCHI, R.P.; LANCHETA Jr., A.H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.47, n.2, p. 111-127, 2003.
- PETERSIDE, I.E.; SELAK, M.A.; SIMMONS, R.A. Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria in growth-retarded rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**, v.285, p.E1258–E1266, 2003.
- PICONE, O.; et al. Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. **Theriogenology**, v.75, p.287–299, 2011.
- PINKE, C.A.E. **Mecanismos moleculares na interação da leptina e insulina com a obesidade**. 2008. 42f. Monografia (Pós-graduação *Latu sensu* em Nutrição e Alimentação de Cães e Gatos/Especialização em Nutrição e Alimentação de Cães e Gatos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2008.
- RAO, R.K.; PADMAVATHI, I.J.N.; RAGHUNATHET, M. Maternal micronutrient restriction programs the body adiposity, adipocyte function and lipid metabolism in offspring: a review. **Rev. Endocr. Metab. Disord**, v. 13, p.103-8, 2012.

- REMMERS, F.; DELEMARRE-VAN DE WALL, H.A. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. **Endocrine Reviews**, v.32, n.2, p.272-311, 2011.
- RINAUDO, P.; WANG, E. Fetal programming and metabolic syndrome. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 74, p.107–30, 2012.
- SAHU, A. Minireview: a hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. **Endocrinology**, v.145, p.2613-2620, 2004.
- SCHWARTZ, M.W.; et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v.404, n.6778, p.661-671, 2000.
- SEVILLA, L.; et al. Chronic high-fat feeding and middle-aging reduce in an additive fashion glut4 expression in skeletal muscle and adipose tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.235, p.89-93, 1997.
- SHEPHERD, P.R.; KAHN, B.B. Glucose transporters and insulin action: implications for insulin resistance and diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v.341, p.248–257, 1999.
- SHRADER, R.E.; ZEMAN, F.J. Effect of maternal protein deprivation on morphological and enzymatic development of neonatal rat tissue. **Journal Nutrition**, v.99, p.401-421, 1969.
- SILVEIRA, S.L. **Programação metabólica**: estudos de parâmetros indicadores de resistência à insulina e espécies reativas de oxigênio em ratos. 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Bioquímica/Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.
- STENBIT, A.E.; et al. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. **Archives of Pharmacal Research**, v.22, p.329–334, 1999.
- TAKANO, J. Intestinal changes in protein-deficient rats. **Exp. Mol. Path.**, v.3, p.224-231, 1964.
- TIMOFEEVA, N.M.; EGOROVA, V.V.; NIKITINA, A.A. Quality of nutrition during pregnancy or lactation programs functioning of enzyme systems of digestive and non-digestive organs in “grandchildren” during their adult life. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v.44, p.254-257, 2008.

- VARVARIGOU, A.A. Intrauterine growth restriction as a potencial risk factor for disease onset in adulthood. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v.23, p.215-224, 2010.
- VEIGA, A.P.M. Obesidade e diabetes mellitus em pequenos animais. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA E VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL. 2., 2005, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005, p. 82 – 91.
- VELKOSKA, E.; et al. Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats. **The Journal of Nutrition**, v.138, p.1622-1627, 2008.
- VICKERS, M.H.; et al. Fetal origins of hyperphagia, obesity and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **American Journal of Endocrinology Metabolic**, v.279, p.E83-E87, 2000.
- VICKERS, M.H; et al. Dysregulation of the adipoinsular axis – a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. **Journal of Endocrinology**, v. 170, p. 323–332, 2001.
- VICKERS, M.H.; et al. Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.285, n.154-1, p. R271-R273, 2003.
- WOODS, S.C.; et al. Regulation of energy homeostasis by peripheral signals. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.18, n.4, p.497-515, 2004.

## **Capítulo II**

**Restrição nutricional materna associada à dieta  
hiperlipídica pós-desmame e seu efeito no  
desenvolvimento e metabolismo de ratos adultos**

## **RESTRIÇÃO NUTRICIONAL MATERNA ASSOCIADA À DIETA HIPERLIPÍDICA PÓS-DESMAME E SEU EFEITO NO DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO DE RATOS ADULTOS**

### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da restrição nutricional materna na gestação e/ou lactação sobre o desempenho e metabolismo de gordura e glicose em ratos machos adultos alimentados com dieta hiperlipídica (H) ou dieta padrão (C) pós-desmame (3-16 semanas). Ratos machos nascidos de mães alimentadas *ad libitum* (controle) ou que sofreram restrição calórica de 30% (restrito) durante a gestação e/ou lactação foram distribuídos em seis grupos experimentais: CCC (provenientes de mães alimentadas com dieta C na gestação e lactação, com dieta C pós-desmame); CCH (provenientes de mães alimentadas com dieta C na gestação e lactação, com dieta H pós-desmame,); RCC (provenientes de mães restritas na gestação e controle na lactação, com dieta controle após desmame); RCH (provenientes de mães restritas na gestação e controle na lactação, com dieta H após desmame); RRC (provenientes de mães restritas na gestação e lactação, com dieta controle após desmame); RRH (provenientes de mães restritas na gestação e lactação, com dieta H após desmame). Foram avaliados o desenvolvimento corpóreo, o peso do tecido adiposo, fígado, órgãos do trato gastrointestinal, pâncreas, expressão gênica do GLUT4 e parâmetros do metabolismo de gordura e glicose. A restrição nutricional materna prejudicou o crescimento corpóreo, o desenvolvimento de vários órgãos como fígado e trato gastrointestinal, e provocou alterações no metabolismo lipídico e glicose. A dieta hiperlipídica alterou o metabolismo hepático. A restrição alimentar materna gerou indivíduos adultos com maior propensão ao desenvolvimento de alterações metabólicas, como a resistência à insulina. A dieta hiperlipídica pós-desmame não compensou os efeitos da restrição na gestação e lactação, resultando em animais com menor peso corporal, no entanto, induziu modificações metabólicas hepáticas que representam um sinalizador clínico importante para resistência à insulina mesmo na ausência da obesidade.

**Palavras-chave:** programação fetal; gestação; lactação; lipídeos; glicose.

## **MATERNAL NUTRITION RESTRICTION ASSOCIATED WITH HIGH-FAT DIET POST-WEANING AND EFFECT IN METABOLISM AND DEVELOPMENT OF ADULT RATS**

### **Abstract**

The aim of this study was to evaluate the effect of moderate maternal undernutrition during pregnancy and/or lactation on animal development and metabolic outcomes in adult male rats fed high-fat (H) or standart (C) diet after weaning (3 to 16 weeks of age). Male rats born to dams fed *ad libitum* (control) or dams undernutrition to 30% of control throughout pregnancy or lactation were assigned to six groups: CCC (rats born to dams fed C diet during pregnancy and lactation, and fed C diet after weaning); CCH (rats born to dams fed C diet during pregnancy and lactation, and fed H diet after weaning); RCC (rats born to dams undernutrition to 30% during pregnancy, C diet during lactation, and fed C diet after weaning); RCH (rats born to dams undernutrition to 30% during pregnancy, C diet during lactation, and fed H diet after weaning); RRC (rats born to dams undernutrition to 30% during pregnancy and lactation, and fed C diet after weaning); RRH (rats born to dams undernutrition to 30% during pregnancy and lactation, and fed H diet after weaning). We evaluated body development, weight of some tissue fat, liver, organs of the gastrointestinal tract, pancreas, GLUT4 gene expression and parameters of fat and glucose metabolism. Moderate maternal undernourishment impaired body growth, development of various organs such as liver and gastrointestinal tract, and caused alterations in lipid metabolism and glucose. High-fat diet altered hepatic metabolism. Maternal nutritional restriction resulting adults animals with increased predisposition to develop metabolic changes, like as insulin resistance. High-fat diet post-weaning didn't offset the effects of maternal dietary undernutrition during pregnancy and lactation, generating adult animals smaller than those fed standard diet, however, induced hepatic metabolic changes which represents a important signal clinical for insulin resistance even in the absence of obesity.

**Keywords:** fetal programming; pregnancy; lactation; lipids; glucose.

### **Introdução**

A gestação é um período muito importante para a saúde do indivíduo gerado. Diversos estudos vêm demonstrando que condições de estresse e mudanças nutricionais durante este período provocam uma resposta adaptativa para sobrevivência em um ambiente hostil, redistribuindo os nutrientes ingeridos para órgãos mais vitais como cérebro, fígado e pâncreas, melhorando a capacidade de sobrevivência (PETRY et al., 1997; MARTIN-GRONERT e OZANNE, 2005; FERNANDEZ-TWINN e OZANNE, 2006). No entanto, se após o nascimento, o ambiente torna-se mais favorável e o aporte nutricional melhora, essas adaptações tornam-se prejudiciais, podendo ser a origem de diversas doenças cardiovasculares, renais e metabólicas no início da vida adulta (McMILLEN e ROBINSON, 2005; BARKER, 2007).

Alterações na alimentação materna no período gestacional e neonatal, como a restrição nutricional, seja ela global, proteica ou de micronutrientes (RAO et al., 2012), agem na formação fetal, modificando todo o seu metabolismo, deixando-o mais suscetível ao desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e diabetes quando tornar-se um jovem adulto (SEKI et al., 2012).

Segundo Rinaudo e Wang (2012), condições adversas em qualquer fase da gestação levam a intolerância à glicose e, se estas ocorrerem no final da gestação, provocarão alterações no metabolismo intermediário, pois é nesta fase gestacional que ocorre a deposição de gordura.

Além disso, a distribuição dos nutrientes pela placenta se dá de forma diferenciada entre os fetos de gestação múltipla dependendo da sua distribuição dentro do útero. Assim filhotes que nascem mais leves refletem menor fornecimento de nutrientes pela placenta e podem apresentar fenótipos diferentes quando adultos (DESAI et al., 2007; NISSEN et al., 2011).

Estudos de Howie et al. (2012) mostram que o nível nutricional nos períodos de gestação e lactação é importante para a determinação do fenótipo metabólico da prole. Quando há restrição nutricional na gestação com oferta de alimentos na lactação, em comparação a fêmeas restritas nos dois períodos, acarreta em maiores prejuízos a longo prazo na progênie, como a obesidade e a síndrome metabólica, mas quando a restrição

nutricional acontece desde a concepção até o desmame, há mais consequências adversas a prole associadas ao rápido crescimento compensatório, principalmente em fêmeas.

Além disso, o consumo de dieta hipercalórica pós-natal pode amplificar os efeitos metabólicos anormais da desnutrição intrauterina (VICKERS et al., 2000; VICKERS et al., 2001; VICKERS et al., 2003). No entanto, há poucos estudos que correlacionam a desnutrição no período gestacional e lactacional com uma dieta com alto teor energético na fase pós-desmame.

Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento corpóreo e o metabolismo lipídico e de glicose em ratos machos adultos nascidos de mães que sofreram restrição calórica de 30% no período da gestação e/ou lactação, recebendo, após o desmame, dieta hiperlipídica.

## **Material e Métodos**

### **Fase I – Mães**

#### **Gestação**

Foram utilizadas 48 fêmeas primíparas de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com aproximadamente 16 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UNESP – Botucatu, para acasalamento aleatório poligâmico de duas fêmeas para um macho em cada caixa. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em biotério com controle do fotoperíodo (12h de luz) e a temperatura foi mantida em  $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Foi realizado um período de adaptação da entrada dos animais no biotério ao início do experimento de dois meses e durante esse período, tanto machos quanto fêmeas foram vermifugados com produto comercial com base de praziquantel, na dosagem de 20mg de suspensão por kg de peso vivo, após exame parasitológico com a metodologia de Willis (1921) e Graham (1941) para detecção de parasitas internos. Todos os animais apresentaram exame parasitológico negativo após vermifugação e foram utilizados neste estudo.

Na manhã seguinte ao acasalamento, os machos foram retirados e o diagnóstico de prenhez realizado por esfregaço vaginal, sendo que a presença de espermatozóides marcou o primeiro dia de gestação. Neste momento, as fêmeas foram transferidas para caixas individuais para formação dos grupos experimentais. Os animais, durante o período de

acasalamento, foram alimentados com ração comercial padrão de biotério (Nuvilab CR-1®) e água *ad libitum*.

Durante o período de gestação as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais que diferiram quanto ao manejo alimentar, sendo um grupo controle (n=16), formado por ratas alimentadas *ad libitum* com dieta controle (Tabela 1) e um grupo restrito (n=32) com fêmeas alimentadas com restrição de 30% da quantidade ingerida pelo grupo controle, provocando, desta forma, uma restrição calórico-protéica. A quantidade de alimento fornecida ao grupo restrito foi calculada diariamente utilizando o consumo médio das fêmeas do grupo controle, desta forma ajustando a ingestão com a fase gestacional.

Após o nascimento, os filhotes foram pesados individualmente e o tamanho da ninhada registrado e ajustado para oito filhotes por fêmea (quatro machos e quatro fêmeas). Foram selecionados dois machos e duas fêmeas de maior peso e dois machos e duas fêmeas de menor peso corporal, que foram mantidos com a mãe até o final do período da lactação. Embora no presente estudo apenas ratos machos tenham sido utilizados, este procedimento foi adotado com o objetivo de manter a igualdade de proles. Os filhotes excedentes foram sacrificados por decapitação.

### **Lactação**

Ao nascimento dos filhotes, as mães do grupo que sofreram restrição alimentar durante a gestação foram divididas aleatoriamente em dois tratamentos que diferiram quanto ao manejo alimentar. O grupo controle permaneceu recebendo o mesmo manejo alimentar do período gestacional. Desta maneira, durante a lactação, foram formados três grupos:

CC (controle/controle, n=16) = mães alimentadas *ad libitum* durante a gestação e lactação;

RC (restrito/controle, n=16) = mães submetidas à restrição alimentar de 30% durante a gestação e alimentadas *ad libitum* durante a lactação;

RR (restrito/restrito, n=16) = mães submetidas à restrição alimentar de 30% durante a gestação e lactação.

A restrição alimentar do grupo restrito foi corrigida diariamente considerando o consumo médio diário das fêmeas do grupo controle, de acordo com a fase da lactação.

Durante a gestação e lactação as mães foram pesadas semanalmente, assim como no dia do nascimento dos filhotes. O consumo de ração das ratas foi controlado diariamente e

foi calculado a ingestão alimentar (IA) e energia ingerida (EI) por período, de acordo com as seguintes fórmulas:

$$IA \text{ (g)} = \Sigma(\text{consumo alimentar 1-21 dias})$$

$$EI \text{ (Kcal)} = IA \times \text{Energia Ração}^*/1000$$

Os filhotes foram pesados semanalmente até o momento do desmame.

## **Fase II – Prole**

### **Animais com três semanas de idade**

No momento do desmame (três semanas de idade), o macho de menor peso de cada prole foi separado e mantido em gaiola individual até atingir 16 semanas de idade, quando então foi sacrificado. O segundo macho de menor peso de cada prole foi sacrificado ao desmame. As fêmeas foram descartadas e sacrificadas em câmara de CO<sub>2</sub>.

### **Animais com 16 semanas de idade**

Os filhotes machos de menor peso foram distribuídos em seis grupos (n=8):

CCC – ratos machos alimentados com dieta controle após desmame, provenientes de mães que receberam dieta controle na gestação e lactação;

CCH – ratos machos alimentados com dieta hiperlipídica após desmame, provenientes de mães que receberam dieta controle na gestação e lactação;

RCC – ratos machos alimentados com dieta controle após desmame, provenientes de mães que receberam dieta com restrição de 30% na gestação e dieta controle na lactação;

RCH – ratos machos alimentados com dieta hiperlipídica após desmame, provenientes de mães que receberam dieta com restrição de 30% na gestação e dieta controle na lactação;

RRC – ratos machos alimentados com dieta controle após desmame, provenientes de mães que receberam dieta com restrição de 30% na gestação e lactação;

RRH – ratos machos alimentados com dieta hiperlipídica após desmame, provenientes de mães que receberam dieta com restrição de 30% na gestação e lactação.

Os filhotes foram pesados semanalmente até o momento do sacrifício. O controle do consumo alimentar foi feito três vezes por semana durante todo o período experimental.

---

\* Consultar Tabela 2 para o valor de energia da ração.

## Dietas

As dietas utilizadas durante o período experimental foram formuladas pelo programa Super Crac 5.7 Windows – versão Máster, de acordo com as recomendações do NRC (1995) e AIN-93 e foram preparadas pela PragSoluções (Jaú, SP). A composição das rações está descrita na tabela 1 e os valores da análise bromatológica na tabela 2.

**Tabela 1.** Composição das rações controle e hiperlipídica.

| Dieta Controle                        |                | Dieta Hiperlipídica                   |                |
|---------------------------------------|----------------|---------------------------------------|----------------|
| Ingrediente                           | Quantidade (%) | Ingrediente                           | Quantidade (%) |
| Milho (grão)                          | 46,80          | Milho (grão)                          | 34,04          |
| Farelo de Soja 45%                    | 30,50          | Farelo de Soja 45%                    | 0,00           |
| Soja integral tostada                 | 10,00          | Soja integral tostada                 | 49,90          |
| Farelo de Trigo                       | 2,00           | Farelo de Trigo                       | 2,00           |
| Gordura de suínos                     | 5,50           | Gordura de suínos                     | 5,00           |
| Óleo de Soja                          | 1,00           | Óleo de Soja                          | 4,78           |
| Açúcar                                | 2,00           | Açúcar                                | 2,00           |
| Supl. Vitamínico-mineral <sup>1</sup> | 1,00           | Supl. vitamínico-mineral <sup>1</sup> | 1,00           |
| DL-metionina                          | 0,03           | DL-metionina                          | 0,03           |
| L-lisina HCl                          | 0,01           | L-lisina HCl                          | 0,01           |
| Calcário                              | 0,82           | Calcário                              | 0,87           |
| Sal comum                             | 0,30           | Sal comum                             | 0,30           |
| BHT                                   | 0,10           | BHT                                   | 0,10           |

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico-mineral (PragSoluções®). Nível de inclusão por Kg de suplemento: ácido nicotínico 0,300%; pantotenato de cálcio 0,160%; piridoxina HCl 0,070%; Tiamina HCl 0,060%; Riboflavina 0,060%; ácido fólico 0,020%; biotina 0,002%; vitamina B12 0,250%; vitamina E 0,750%; vitamina A 0,040%; vitamina D3 0,000%; vitamina K3 0,030%; cloreto de colina 6,000%; inositol 1,100%; lisina 14,000%; metionina 14,000%; sulfato de potássio 4,078%; óxido de magnésio 1,932%; citrato de ferro 2,354%; carbonato de zinco 0,202%; carbonato de manganês 0,055%; carbonato cúprico 0,126%; iodato de potássio 0,116%; selenato de sódio 0,043%; para-molibdato de amônio 0,280%; meta silicato de sódio 0,508%; sulfato de cromo-potássio 0,963%; cloreto de lítio 0,609%; ácido bórico 2,853%; fluoreto de sódio 2,223%; carbonato de níquel 1,113%; vanadato de amônio 0,231%.

**Tabela 2.** Valores de análise bromatológica das rações controle e hiperlipídica.

| Ração         | MS <sup>1*</sup><br>(%) | PB <sup>2*</sup><br>(%) | EE <sup>3*</sup><br>(%) | CINZAS <sup>4*</sup><br>(%) | FB <sup>4*</sup><br>(%) | ENN <sup>5†</sup><br>(%) | EB <sup>6**</sup><br>(Kcal/Kg) |
|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Controle      | 95,42                   | 22,95                   | 10,67                   | 3,88                        | 3,15                    | 54,77                    | 4559                           |
| Hiperlipídica | 92,69                   | 22,71                   | 26,10                   | 3,72                        | 3,20                    | 36,96                    | 5134                           |

<sup>1</sup>Matéria Seca; <sup>2</sup>Proteína Bruta; <sup>3</sup>Extrato Etéreo; <sup>4</sup>Fibra Bruta; <sup>5</sup>Extrato Não Nitrogenado; <sup>6</sup>Energia Bruta. \*Resultados expressos em 100% de MS<sup>1</sup>, Laboratório de Bromatologia-Departamento de Nutrição e Melhoramento Animal-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP, campus de Botucatu/SP; \*\*Valores de EB<sup>5</sup> expressos na 2ª MS<sup>1</sup>, Laboratório de Nutrição Animal-Departamento de Zootecnia-Faculdade de Ciências Agrárias-UNESP, campus de Jaboticabal/SP. †ENN=100-[(100-%MS)+%PB+%EE+%FB+%CINZAS]

## **Metodologia Utilizada**

### **Animais com três e 16 semanas de idade**

O sacrifício dos animais foi realizado no período da manhã, sem prévio jejum. Após sacrifício por decapitação, o fígado foi rapidamente removido, pesado e congelado para posterior análise do teor de gordura, através do método de Folch et al. (1957).

Os órgãos do trato gastrointestinal (estômago, intestino delgado e intestino grosso), foram retirados, lavados e pesados. Em seguida, o pâncreas foi retirado e pesado. O intestino delgado foi medido e dividido em suas três porções, sendo que foram considerados duodeno a porção dos 15cm iniciais e íleo, os 15cm finais. O jejuno constituiu-se pela porção mediana do intestino delgado.

Os depósitos de gordura da região visceral, retroperitoneal e periepididimal foram retirados e pesados. Foi determinado o índice de adiposidade (TAYLOR e PHILLIPS, 1996) através da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de adiposidade} = [(gord. \text{ periepididimal} + \text{retroperitoneal} + \text{visceral}) / \text{peso corporal}] \times 100$$

Também foi utilizado o índice de Lee ou razão nutritiva como um medidor da obesidade (BERNARDIS e PATTERSON, 1968) e para tal foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Lee} = [\text{massa corporal (g)}]^{1/3} / \text{comprimento Naso-anal (cm)}$$

A carcaça dos animais, constituída por cabeça e corpo sem as vísceras, foi pesada e colocada em solução de KOH 6N. Após digestão, a gordura da carcaça foi determinada pelo método de Jansen et al. (1966).

Para a determinação dos teores de glicose e lipídeos séricos foram coletadas, no momento do sacrifício, amostras de sangue em tubos de centrífuga. Essas amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3.500 rpm para separação do soro. Alíquotas do soro foram retiradas e armazenadas em freezer a - 5°C para posterior análise. Os níveis séricos de glicose, colesterol total, triglicerídeos e HDL-colesterol foram determinados por kits comerciais, seguindo as instruções do fabricante, utilizando o analisador bioquímico BS-200 da marca Mindray. O teor de VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) foi calculado utilizando-se a Equação de Friedewald, dividindo-se o teor de triglicerídeos

plasmáticos por cinco. O LDL (lipoproteína de baixa densidade) foi calculado subtraindo-se o valor de HDL e VLDL do valor de colesterol total (FRIEDEWALD et al., 1972).

### **Animais com 16 semanas de idade**

A ingestão alimentar (IA), energia ingerida (EI) e conversão alimentar (CA) foram calculadas de acordo com as seguintes fórmulas:

$$IA \text{ (g)} = \Sigma(\text{consumo alimentar 3-16 semanas idade})$$

$$EI \text{ (Kcal)} = IA \times \text{Energia Ração}/1000$$

$$CA = IA / GP \text{ (3-16 semanas idade)}$$

O Teste de Tolerância à Glicose (TTG) foi feito uma semana antes do sacrifício. Após jejum de 12-14 horas, os animais receberam solução de glicose a 50%, via gavagem, na dosagem de 2mg/g de peso animal. Amostras de sangue foram coletadas por pequena perfuração na cauda dos animais antes e aos 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de glicose. A glicemia foi determinada utilizando-se um glicosímetro da marca Prestige Smart System. A resposta de glicose do teste foi estimada pela área total abaixo da curva (AUC), utilizando o método trapezoidal estabelecido por Tai (1994) e utilizado por Campos et al. (2007).

Amostras de fígado coletado foram separadas, pesadas e utilizadas para determinação de glicogênio através de reação colorimétrica, medida em espectrofotômetro Bel Photonics 2000UV, segundo o método de Krisman (1962).

O RNA total foi extraído pelo protocolo Trizol (Invitrogen®) em amostras do músculo sóleo e do tecido adiposo periepídídimo. O RNA total obtido foi mensurado por espectrofotometria (Nanodrop-Eppendorf®). A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com 1 µl DNase Amplification Grade (Life Technologies®) de acordo com o protocolo do fabricante, antes de serem submetidas à Transcrição Reversa (RT). Após esse procedimento, as amostras foram submetidas à RT utilizando-se a enzima Omniscript (Qiagen®). O cDNA obtido foi armazenado em freezer -20°C para posterior utilização na PCR em tempo real (RT-qPCR). A expressão do gene alvo GLUT4 foi investigada por RT-qPCR utilizando o sistema Power Sybr Green PCR Master Mix (Life Technologies®) no equipamento ABI Prism 7500 (Life Technologies®). Os

oligonucleotídeos iniciadores foram delineados a partir de sequências de *Rattus norvegicus* disponíveis no banco de dados GenBank. A expressão gênica relativa ao gene constitutivo foi calculada utilizando-se o método  $\Delta\Delta C_t$  e foi corrigida pela eficiência de amplificação das reações utilizando-se a equação descrita por Pfaffl (PFAFFL, 2001). O gene constitutivo foi o GAPDH para *Rattus norvegicus*. As sequências dos primers e condições da corrida estão descritas na tabela 3.

**Tabela 3.** Sequências, condições de corrida e tamanhos dos fragmentos de *primers* utilizados para PCR em tempo real (RT-qPCR).

| Gene  | Sequência                                | Tamanho do fragmento (pb) | Temperatura de anelamento (°C) | Concentração do primer (nM) |
|-------|------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| GAPDH | S 5' tga ctc tac cca cgg caa gtt caa 3'  | 141                       | 60                             | 200                         |
|       | AS 5' acg aca tact ca gca cca gca tca 3' |                           |                                |                             |
| GLUT4 | S 5' tct ctg tgg gtg gca tga ttt cct 3'  | 87                        | 60                             | 300                         |
|       | AS 5' cat tgt tgg cca gca tag ccc ttt 3' |                           |                                |                             |

S = *primer* sense; AS = *primer* anti-sense; pb = pares de base

### Análise Estatística

A comparação dos dados referentes ao consumo alimentar e peso das ratas-mãe foi realizada com o auxílio do teste T de *Student* com nível de significância de 5%.

Os dados obtidos dos animais com três semanas de idade foram analisados pela análise de variância sendo complementado pelo teste de Dunnett, com nível de significância de 5%, avaliando a diferença dos grupos restritos na gestação e/ou lactação com o grupo controle. Já os dados de animais com 16 semanas de idade foram analisados por meio de análise de variância e complementada pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%, em esquema fatorial de 3x2, sendo três níveis de alimentação na gestação e lactação (*ad libitum*, restrito somente na gestação e restrito na gestação e lactação) e dois níveis de dieta após o desmame (dieta controle e hiperlipídica). A análise estatística dos dados foi feita com o auxílio do software Minitab 16.

Os procedimentos experimentais foram feitos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

(COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências de Botucatu (processo nº 338/2011-CEEA).

## Resultados

### Consumo alimentar e peso corpóreo das mães

Durante a gestação, o consumo de alimento total e o consumo de energia das ratas restritas foi significativamente menor do que aquele observado nas ratas controle ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). No entanto, no período de lactação, as mães que passaram por restrição alimentar somente na gestação (grupo RC) apresentaram maior consumo total de alimento comparado com o consumo observado nas ratas CC e RR (Tabela 4), mostrando um consumo alimentar compensatório destas ratas quando não estavam mais sob restrição alimentar.

**Tabela 4.** Ingestão alimentar total (IA), energia ingerida (EI) de ratas-mãe nos períodos de gestação e lactação.

|           | Gestação                    |                            | Lactação                    |                             |                             |
|-----------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|           | C                           | R                          | CC                          | RC                          | RR                          |
| IA (g)    | 412,21±41,82 <sup>a</sup>   | 278,72±11,26 <sup>b</sup>  | 851,14±84,92 <sup>b</sup>   | 925,75±100,84 <sup>a</sup>  | 575,32±30,52 <sup>c</sup>   |
| EI (Kcal) | 1879,26±190,66 <sup>a</sup> | 1430,96±57,88 <sup>b</sup> | 3880,14±387,17 <sup>b</sup> | 4220,50±459,71 <sup>a</sup> | 2477,16±632,78 <sup>c</sup> |

C = alimentação *ad libitum* e R = restrição alimentar de 30%. A primeira letra representa o tratamento durante o período gestacional e a segunda letra, o período da lactação. Gestação: C (n=16) e R (n=32). Lactação: n=16 /grupo experimental.

<sup>a, b, c</sup> Médias ± desvio padrão na gestação ou lactação seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste T de Student ( $p < 0,05$ ).

As ratas que sofreram restrição de alimento no período da gestação apresentaram peso corpóreo significativamente menor do que aquele observado no grupo controle nos dias 7, 14 e 21 de gestação (Figura 1A). As ratas que sofreram restrição apenas na gestação (grupo RC) iniciaram o período da lactação com peso menor ( $p < 0,05$ ) do que as fêmeas do grupo controle e apresentaram um aumento de peso gradual, alcançando o peso corpóreo semelhante ao do grupo controle aos 21 dias de lactação (Figura 1B). Por outro lado, nas ratas restritas na gestação e lactação (grupo RR) o peso corpóreo foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que o das ratas controle durante todo o período da lactação (Figura 1B).

O tamanho das ninhadas não diferiu entre os grupos, com tamanho médio para o grupo controle de 12,11±2,03 filhotes e para o grupo restrito de 11,68±2,81 filhotes.

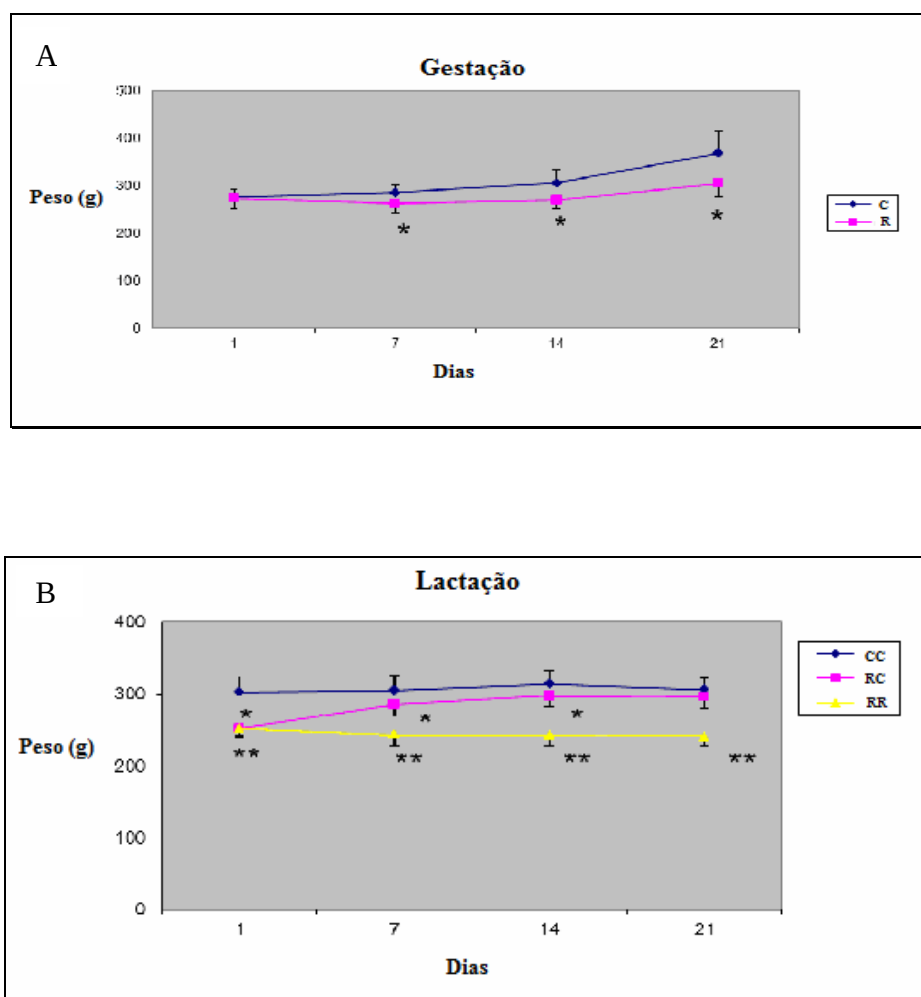


**Figura 1.** Evolução do peso corporal (g) das ratas-mãe do dia 1 ao 21 dos períodos gestacional (A) e lactacional (B).

### Animais com três semanas de idade

A restrição nutricional materna de 30% na gestação reduziu o peso dos filhotes ao nascer ( $p < 0,05$ ). Ao desmame, o grupo RR apresentou menor peso corpóreo, peso de carcaça e ganho de peso quando comparado ao grupo CC ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5).

A deposição de gordura nos animais de três semanas foi influenciada pela restrição nutricional na gestação e na lactação. Comparado com o grupo CC, o grupo RR apresentou menor peso de gordura retroperitoneal e periepididimal ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, a gordura corporal total do grupo RR foi menor ( $p < 0,05$ ), mesmo a gordura visceral não sendo estatisticamente diferente do grupo CC ( $p > 0,05$ ), assim como o índice de adiposidade ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6).

**Tabela 5.** Comparação entre as médias±desvio padrão do peso corpóreo, ganho de peso e peso de carcaça em ratos de três semanas de idade.

|          | CC         | RC         | RR          |
|----------|------------|------------|-------------|
| P0 (g)   | 6,34±0,75  | 5,91±0,69* | 5,98±0,68*  |
| P3 (g)   | 48,01±4,47 | 47,65±5,59 | 33,17±2,24* |
| GP (g)   | 41,67±4,27 | 41,75±5,20 | 27,19±2,03* |
| PCar (g) | 37,94±3,86 | 37,90±4,99 | 26,59±2,09* |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação (n=16/ grupo experimental).

Médias ± desvio padrão\* indica diferença com o grupo CC pelo teste Dunnett, ao nível de 5% de significância.

P0: Peso ao Nascer; P3: Peso com três semanas de idade; GP: Ganho de Peso; PCar: Peso de Carcaça de 0 a 3 semanas de idade.

O grupo RC apresentou maior depósito de gordura visceral quando comparado ao grupo CC ( $p<0,05$ ) e maior índice de adiposidade ( $p<0,05$ ), como pode ser observado na tabela 6. O teor de gordura hepática foi maior para o grupo RR ( $p<0,05$ ) e o teor de gordura de carcaça do grupo RR foi menor ( $p<0,05$ ) quando comparado ao grupo CC (Tabela 6).

**Tabela 6.** Comparação entre as médias±desvio padrão do peso dos depósitos de gordura, índice de adiposidade e teor de gordura hepática (%) e de carcaça (%) em ratos de três semanas de idade.

|                             | CC         | RC         | RR         |
|-----------------------------|------------|------------|------------|
| Gordura Retroperitoneal (%) | 0,29±0,11  | 0,36±0,10  | 0,13±0,06* |
| Gordura Periepididimal (%)  | 0,22±0,08  | 0,22±0,06  | 0,13±0,04* |
| Gordura Visceral (%)        | 0,53±0,07  | 0,63±0,08* | 0,56±0,11  |
| Gordura Corporal Total (%)  | 0,50±0,12  | 0,58±0,15* | 0,27±0,06* |
| Índice Adiposidade          | 1,05±0,19  | 1,21±0,21* | 0,82±0,16* |
| Gordura Hepática (%)        | 5,02±1,47  | 5,70±0,68  | 6,53±1,63* |
| Gordura de Carcaça (%)      | 11,77±2,49 | 10,49±2,31 | 6,07±1,99* |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação (n=16/grupo experimental).

Médias ± desvio padrão\* indica diferença com o grupo CC pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de significância.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, nos animais de três semanas, o teor de glicose sérica observada no grupo RR foi significativamente menor ( $p<0,05$ ) e houve aumento nos valores de triglicerídeos e VLDL para grupo RR em relação à CC ( $p<0,05$ ),

como mostra a Tabela 7. O colesterol total, o HDL-colesterol e o LDL séricos nos grupos RC e RR não foram diferentes daqueles encontrados para o grupo CC ( $p>0,05$ ).

**Tabela 7.** Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão do perfil lipídico e glicose séricos em animais com três semanas de idade.

|                          | CC                 | RC                 | RR                  |
|--------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Glicose (mg/dl)          | 168,96 $\pm$ 15,75 | 166,40 $\pm$ 13,92 | 153,59 $\pm$ 10,66* |
| Triglicerídeos (mg/dl)   | 178,71 $\pm$ 59,23 | 186,32 $\pm$ 61,89 | 249,43 $\pm$ 58,08* |
| Colesterol total (mg/dl) | 149,45 $\pm$ 26,63 | 138,73 $\pm$ 21,67 | 155,56 $\pm$ 34,49  |
| HDL-colesterol (mg/dl)   | 45,53 $\pm$ 4,06   | 44,35 $\pm$ 5,80   | 44,28 $\pm$ 7,02    |
| VLDL (mg/dl)             | 35,74 $\pm$ 11,85  | 37,26 $\pm$ 12,38  | 49,89 $\pm$ 11,62*  |
| LDL (mg/dl)              | 60,97 $\pm$ 16,15  | 57,12 $\pm$ 14,00  | 67,40 $\pm$ 27,70   |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação (n=16/ grupo experimental). Médias  $\pm$  desvio padrão\* indica diferença com o grupo CC pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de significância.

O peso relativo do estômago, jejuno e intestino grosso nos animais de três semanas de idade, foi maior ( $p<0,05$ ) para o grupo RR e o peso do fígado foi significativamente menor para este mesmo grupo ( $p<0,05$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão do peso dos órgãos do trato gastrointestinal em animais com três semanas de idade.

|                      | CC              | RC              | RR               |
|----------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Estômago (%)         | 0,73 $\pm$ 0,06 | 0,73 $\pm$ 0,06 | 0,83 $\pm$ 0,06* |
| Pâncreas (%)         | 0,43 $\pm$ 0,07 | 0,45 $\pm$ 0,06 | 0,44 $\pm$ 0,09  |
| Fígado (%)           | 3,96 $\pm$ 0,21 | 4,03 $\pm$ 0,30 | 3,77 $\pm$ 0,23* |
| Duodeno (%)          | 1,67 $\pm$ 0,29 | 1,70 $\pm$ 0,28 | 1,68 $\pm$ 0,25  |
| Jejuno (%)           | 3,10 $\pm$ 0,92 | 3,78 $\pm$ 0,92 | 4,41 $\pm$ 1,13* |
| Íleo (%)             | 0,97 $\pm$ 0,28 | 1,08 $\pm$ 0,20 | 1,04 $\pm$ 0,18  |
| Intestino Grosso (%) | 1,09 $\pm$ 0,12 | 1,13 $\pm$ 0,11 | 1,20 $\pm$ 0,14* |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação (n=16/ grupo experimental). Médias  $\pm$  desvio padrão\* indica diferença com o grupo CC pelo teste Dunnett, ao nível de 5% de significância.

Não houve diferença entre os grupos RC ( $p>0,05$ ) e controle CC (Tabela 8). Os outros órgãos do trato gastrointestinal não apresentaram alterações no peso dos animais oriundos dos grupos RC e RR.

### **Animais com de 16 semanas de idade**

Não houve interação entre alimentação materna e dieta pós-desmame no peso corporal com 16 semanas de idade, no peso de carcaça e porcentagem de ganho de peso (Tabela 9). No entanto, a restrição dietética materna na gestação e lactação provocou redução no peso corpóreo dos animais com 16 semanas de idade, assim como o peso de carcaça e o ganho de peso foram reduzidos nestes grupos ( $p<0,05$ ).

O ganho de peso foi significativamente menor para os grupos que sofreram restrição materna na gestação e lactação (RRC e RRH). A dieta hiperlipídica pós-desmame reduziu o peso corporal com 16 semanas de idade, o peso de carcaça e o ganho de peso ( $p<0,05$ ) (Tabela 9).

A ingestão alimentar total, a energia ingerida e a conversão alimentar não apresentaram interação entre a restrição nutricional materna de 30% e dieta após o desmame (Tabela 10).

A restrição alimentar materna na gestação e lactação interferiu na ingestão alimentar total e energia ingerida dos animais após desmame, reduzindo essa ingestão ( $p<0,05$ ), mas não houve influencia na conversão alimentar ( $p>0,05$ ) (Tabela 10).

Já a dieta hiperlipídica provocou menor ingestão alimentar total nos grupos que foram alimentados com ela, em relação aos animais que ingeriram dieta controle, contudo não interferiu na energia ingerida, na conversão e eficiência alimentar ( $p<0,05$ ) (Tabela 10).

Não houve interação entre restrição alimentar materna de 30% e dieta pós-desmame nos depósitos de gordura retroperitoneal, periepididimal, visceral, gordura de carcaça e gordura corporal total, assim como nos índices de adiposidade, índice de Lee e comprimento naso-anal (Tabela 11).

**Tabela 9.** Comparação entre as médias±desvio padrão do peso corpóreo (g), peso de carcaça (g) e ganho de peso (g) em animais da 3ª a 16ª semana de idade.

|               |       | Valores de P               |                             |                            |                         |                                 |
|---------------|-------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------------|
|               | Grupo | CC                         | RC                          | RR                         | Efeito da               | Efeito da                       |
|               |       |                            |                             |                            | alimentação materna (R) | interação pós-desmame (D) (RxD) |
| P16 (g)       | C     | 456,94±34,82 <sup>aA</sup> | 438,89±46,10 <sup>aA</sup>  | 389,98±47,07 <sup>bA</sup> |                         |                                 |
|               | H     | 376,58±44,12 <sup>aB</sup> | 371,15±35,89 <sup>aB</sup>  | 327,30±42,70 <sup>bB</sup> | 0,001                   | <0,001                          |
| PCar (g)      | C     | 394,35±30,71 <sup>aA</sup> | 373,39±41,03 <sup>aA</sup>  | 334,01±41,71 <sup>bA</sup> |                         |                                 |
|               | H     | 321,08±41,22 <sup>aB</sup> | 315,92±33,64 <sup>aB</sup>  | 278,94±37,20 <sup>bB</sup> | 0,001                   | <0,001                          |
| GP (g) (3-16) | C     | 409,09±32,16 <sup>aA</sup> | 393,32±42,18 <sup>abA</sup> | 357,11±45,75 <sup>bA</sup> |                         |                                 |
|               | H     | 330,79±42,27 <sup>aB</sup> | 325,13±36,20 <sup>abB</sup> | 294,86±41,76 <sup>bB</sup> | 0,010                   | <0,001                          |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação; C = dieta controle; H = dieta hiperlipídica (n=8/ grupo experimental).

<sup>a, b</sup>Médias ± desvio padrão na linha seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

<sup>A, B</sup>Médias ± desvio padrão na coluna seguidas de letras maiúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

P16: Peso com 16 semanas de idade; PCar: Peso de Carcaça; GP: Ganho de peso de 3 a 16 semanas de idade.

**Tabela 10.** Comparação entre as médias±desvio padrão da ingestão alimentar (IA), energia ingerida (EI) e conversão alimentar (CA) em animais da 3ª a 16ª semana de idade.

|                 |   | Valores de P                 |                              |                              |                                         |                                       |                                 |
|-----------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Grupo           |   | CC                           | RC                           | RR                           | Efeito da<br>alimentação<br>materna (R) | Efeito da dieta<br>pós-desmame<br>(D) | Efeito da<br>interação<br>(RxD) |
| IA (g)          | C | 1793,64±145,62 <sup>aA</sup> | 1750,46±207,54 <sup>aA</sup> | 1554,19±166,94 <sup>bA</sup> |                                         |                                       |                                 |
|                 | H | 1617,85±205,31 <sup>aB</sup> | 1499,86±252,74 <sup>aB</sup> | 1293,88±93,07 <sup>bB</sup>  | <0,001                                  | <0,001                                | 0,781                           |
| EI<br>(Kcal/Kg) | C | 8177,22±663,89 <sup>a</sup>  | 7980,36±946,16 <sup>a</sup>  | 7085,53±761,10 <sup>b</sup>  |                                         |                                       |                                 |
|                 | H | 8306,04±1054,06 <sup>a</sup> | 7700,26±1297,56 <sup>a</sup> | 6642,76±477,84 <sup>b</sup>  | <0,001                                  | 0,454                                 | 0,659                           |
| CA              | C | 4,39±0,25                    | 4,45±0,22                    | 4,37±0,24                    |                                         |                                       |                                 |
|                 | H | 4,99±1,17                    | 4,66±1,02                    | 4,44±0,49                    | 0,503                                   | 0,144                                 | 0,534                           |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação; C = dieta controle; H = dieta hiperlipídica (n=8/ grupo experimental).

<sup>a, b</sup>Médias ± desvio padrão na linha seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

<sup>A, B</sup>Médias ± desvio padrão na coluna seguidas de letras maiúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Não foi observado efeito da alimentação materna e da dieta após desmame no depósito de gordura visceral, de carcaça e índice de Lee nos animais de 16 semanas. No entanto, a deposição de gordura retroperitoneal e periepididimal sofreu ação da alimentação materna, reduzida na prole de ratas que sofreram restrição na gestação e lactação ( $p < 0,05$ ), independente da dieta recebida pós-desmame (Tabela 11).

O índice de adiposidade apresentou valores significativamente menores para os filhos de ratas que sofreram restrição nutricional materna na gestação e lactação, mas não houve efeito de dieta pós-desmame (Tabela 11).

A gordura corporal total sofreu influência tanto da alimentação materna no período gestacional e lactacional quanto da dieta após desmame. O grupo que sofreu a restrição alimentar materna durante a gestação e lactação apresentou menor peso em relação aos outros grupos ( $p < 0,05$ ). A dieta hiperlipídica reduziu a quantidade de gordura depositada no corpo do animal ( $p < 0,05$ ) (Tabela 11).

O comprimento naso-anal também foi reduzido nos animais que nasceram de mães que sofreram restrição alimentar na gestação e lactação, comparados com os filhos de ratas que sofreram restrição alimentar somente na gestação ( $p < 0,05$ ). A dieta hiperlipídica reduziu o comprimento dos animais ao final de 16 semanas de idade ( $p < 0,05$ ) comparado com a dieta controle (Tabela 11).

Não houve interação entre restrição alimentar materna de 30% e dieta pós-desmame no depósito de gordura hepática e no glicogênio hepático (Tabela 12). O teor de gordura hepática apresentou valores maiores para o grupo em que as mães sofreram dieta restrita somente na gestação ( $p < 0,05$ ), sem sofrer interferências da dieta recebida após o desmame (Tabela 12). A restrição alimentar materna não interferiu nos valores de glicogênio hepático, mas a dieta hiperlipídica reduziu o teor de glicogênio no fígado ( $p < 0,05$ ), comparada a dieta controle (Tabela 12).

Interação entre alimentação materna e dieta após desmame não foi observada para lipídeos e glicose séricos, assim como para área abaixo da curva (AUC) (Tabela 13). A restrição nutricional materna na gestação e/ou lactação determinaram valores de AUC significativamente maiores em relação aos grupos controle ( $p < 0,05$ ); entretanto, não houve efeito de dieta pós-desmame para este parâmetro ( $p > 0,05$ ) (Figura 2).

**Tabela 11.** Comparação entre as médias±desvio padrão do peso dos depósitos de gordura (%), teor de gordura de carcaça (%), índice de adiposidade, índice de Lee e comprimento naso-anal (cm) em animais com 16 semanas de idade.

|                                |   | Valores de P             |                           |                           |                                         |                                       |                                  |
|--------------------------------|---|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Grupo                          |   | CC                       | RC                        | RR                        | Efeito da<br>alimentação<br>materna (R) | Efeito da dieta<br>pós-desmame<br>(D) | Efeito da<br>interação<br>(Rx D) |
| Gordura<br>Retroperitoneal (%) | C | 2,54±0,49 <sup>a</sup>   | 2,20±0,91 <sup>a</sup>    | 1,91±0,98 <sup>b</sup>    |                                         |                                       |                                  |
|                                | H | 2,01±0,45 <sup>a</sup>   | 2,16±0,60 <sup>a</sup>    | 1,66±0,30 <sup>b</sup>    | 0,013                                   | 0,939                                 | 0,388                            |
| Gordura<br>Periepididmal (%)   | C | 2,04±0,37 <sup>a</sup>   | 1,54±0,41 <sup>ab</sup>   | 1,44±0,42 <sup>b</sup>    |                                         |                                       |                                  |
|                                | H | 1,47±0,41 <sup>a</sup>   | 1,57±0,35 <sup>ab</sup>   | 1,22±0,25 <sup>b</sup>    | 0,019                                   | 0,146                                 | 0,107                            |
| Gordura Visceral (%)           | C | 1,72±0,52                | 1,48±0,43                 | 1,38±0,45                 |                                         |                                       |                                  |
|                                | H | 1,50±0,33                | 1,65±0,31                 | 1,35±0,26                 | 0,069                                   | 0,453                                 | 0,298                            |
| Gordura Corporal<br>Total (g)  | C | 27,89±5,28 <sup>aA</sup> | 23,26±8,66 <sup>aA</sup>  | 19,42±9,42 <sup>bA</sup>  |                                         |                                       |                                  |
|                                | H | 18,45±4,70 <sup>ab</sup> | 20,22±5,48 <sup>abB</sup> | 13,85±2,58 <sup>bbB</sup> | 0,002                                   | 0,042                                 | 0,174                            |
| Gordura de Carcaça<br>(%)      | C | 16,44±2,65               | 14,62±2,70                | 14,13±2,29                |                                         |                                       |                                  |
|                                | H | 15,70±2,97               | 18,10±2,62                | 15,26±2,68                | 0,150                                   | 0,592                                 | 0,469                            |
| Índice de Adiposidade          | C | 6,31±1,18 <sup>a</sup>   | 5,22±1,67 <sup>a</sup>    | 4,81±1,66 <sup>b</sup>    |                                         |                                       |                                  |
|                                | H | 4,84±0,86 <sup>a</sup>   | 5,38±0,95 <sup>a</sup>    | 4,,23±0,65 <sup>b</sup>   | 0,013                                   | 0,597                                 | 0,108                            |
| Índice de Lee                  | C | 0,311±0,008              | 0,308±0,007               | 0,308±0,005               |                                         |                                       |                                  |
|                                | H | 0,314±0,020              | 0,310±0,005               | 0,302±0,005               | 0,186                                   | 0,859                                 | 0,375                            |
| Comprimento<br>Naso-anal (cm)  | C | 24,8±0,9 <sup>abA</sup>  | 24,7±1,2 <sup>aA</sup>    | 23,3±0,8 <sup>bA</sup>    |                                         |                                       |                                  |
|                                | H | 22,7±1,9 <sup>abB</sup>  | 23,3±0,9 <sup>abB</sup>   | 22,8±0,7 <sup>bbB</sup>   | 0,053                                   | 0,001                                 | 0,216                            |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação; C = dieta controle; H = dieta hiperlipídica (n=8 para cada grupo experimental).

<sup>a, b</sup> Médias ± desvio padrão na linha seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

<sup>A, B</sup> Médias ± desvio padrão na coluna seguidas de letras maiúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

**Tabela 12.** Comparação entre as médias±desvio padrão do teor de gordura hepática (%) e glicogênio hepático (%) em animais com 16 semanas de idade.

|                         |   | Valores de P           |                        |                         |                                         |                                 |                                 |
|-------------------------|---|------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Grupo                   |   | CC                     | RC                     | RR                      | Efeito da<br>alimentação<br>materna (R) | Efeito da<br>pós-desmame<br>(D) | Efeito da<br>interação<br>(RxD) |
| Gordura Hepática (%)    | C | 5,85±0,60 <sup>b</sup> | 6,39±0,90 <sup>a</sup> | 6,06±0,78 <sup>ab</sup> |                                         |                                 |                                 |
|                         | H | 6,26±1,01 <sup>b</sup> | 6,67±0,75 <sup>a</sup> | 6,31±0,79 <sup>ab</sup> | 0,026                                   | 0,812                           | 0,858                           |
| Glicogênio Hepático (%) | C | 2,42±0,55 <sup>A</sup> | 2,58±0,72 <sup>A</sup> | 2,40±0,21 <sup>A</sup>  |                                         |                                 |                                 |
|                         | H | 1,66±0,47 <sup>B</sup> | 2,36±0,30 <sup>B</sup> | 2,30±0,20 <sup>B</sup>  | 0,069                                   | 0,023                           | 0,175                           |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação; C = dieta controle; H = dieta hiperlipídica (n=8 para cada grupo experimental).

<sup>a, b</sup> Médias ± desvio padrão na linha seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

<sup>A, B</sup> Médias ± desvio padrão na coluna seguidas de letras maiúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

**Tabela 13.** Comparação entre as médias±desvio padrão da área total abaixo da curva glicêmica (AUC), perfil lipídico e glicose séricos em animais com 16 semanas de idade.

|                             |       | Valores de P               |                            |                            |                                         |                                        |                                 |
|-----------------------------|-------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------|
|                             | Grupo | CC                         | RC                         | RR                         | Efeito da<br>alimentação<br>materna (R) | Efeito da<br>dieta pós-<br>desmame (D) | Efeito da<br>interação<br>(RxD) |
| Triglicerídeos<br>(ml/dl)   | C     | 100,42±45,15 <sup>A</sup>  | 67,19±28,02 <sup>A</sup>   | 80,45±26,27 <sup>A</sup>   |                                         |                                        |                                 |
|                             | H     | 44,13±6,72 <sup>B</sup>    | 58,88±20,05 <sup>B</sup>   | 43,91±16,11 <sup>B</sup>   | 0,542                                   | <0,001                                 | 0,066                           |
| Glicose (ml/dl)             | C     | 179,39±10,45               | 171,79±20,02               | 170,47±13,65               |                                         |                                        |                                 |
|                             | H     | 176,35±20,78               | 177,94±34,69               | 184,57±17,52               | 0,848                                   | 0,383                                  | 0,470                           |
| Colesterol total<br>(ml/dl) | C     | 107,14±20,02               | 98,82±36,04                | 90,63±24,67                |                                         |                                        |                                 |
|                             | H     | 106,14±21,26               | 92,80±7,00                 | 97,00±21,01                | 0,380                                   | 0,510                                  | 0,976                           |
| HDL-colesterol<br>(ml/dl)   | C     | 30,73±4,26                 | 27,34±4,79                 | 29,85±5,12                 |                                         |                                        |                                 |
|                             | H     | 31,55±4,28                 | 33,13±2,60                 | 33,25±4,48                 | 0,763                                   | 0,054                                  | 0,210                           |
| VLDL<br>(ml/dl)             | C     | 20,08±9,03 <sup>A</sup>    | 13,44±5,60 <sup>A</sup>    | 16,09±5,25 <sup>A</sup>    |                                         |                                        |                                 |
|                             | H     | 8,83±1,34 <sup>B</sup>     | 11,78±4,01 <sup>B</sup>    | 8,78±3,22 <sup>B</sup>     | 0,542                                   | <0,001                                 | 0,066                           |
| LDL<br>(ml/dl)              | C     | 56,32±14,95                | 58,05±34,20                | 48,10±17,81                |                                         |                                        |                                 |
|                             | H     | 62,30±17,35                | 47,91±7,89                 | 51,13±14,17                | 0,418                                   | 0,950                                  | 0,508                           |
| AUC<br>(mg/dl/120min)       | C     | 12032±2244,26 <sup>b</sup> | 15559±3047,86 <sup>a</sup> | 14214±2493,98 <sup>a</sup> |                                         |                                        |                                 |
|                             | H     | 13427±2339,99 <sup>b</sup> | 14361±2306,28 <sup>a</sup> | 15009±3062,35 <sup>a</sup> | 0,044                                   | 0,665                                  | 0,359                           |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação; C = dieta controle; H = dieta hiperlipídica (n=8/ grupo experimental).

<sup>a, b</sup> Médias ± desvio padrão na linha seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste F (p<0,05)

<sup>A, B</sup> Médias ± desvio padrão na coluna seguidas de letras maiúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste F (p<0,05)

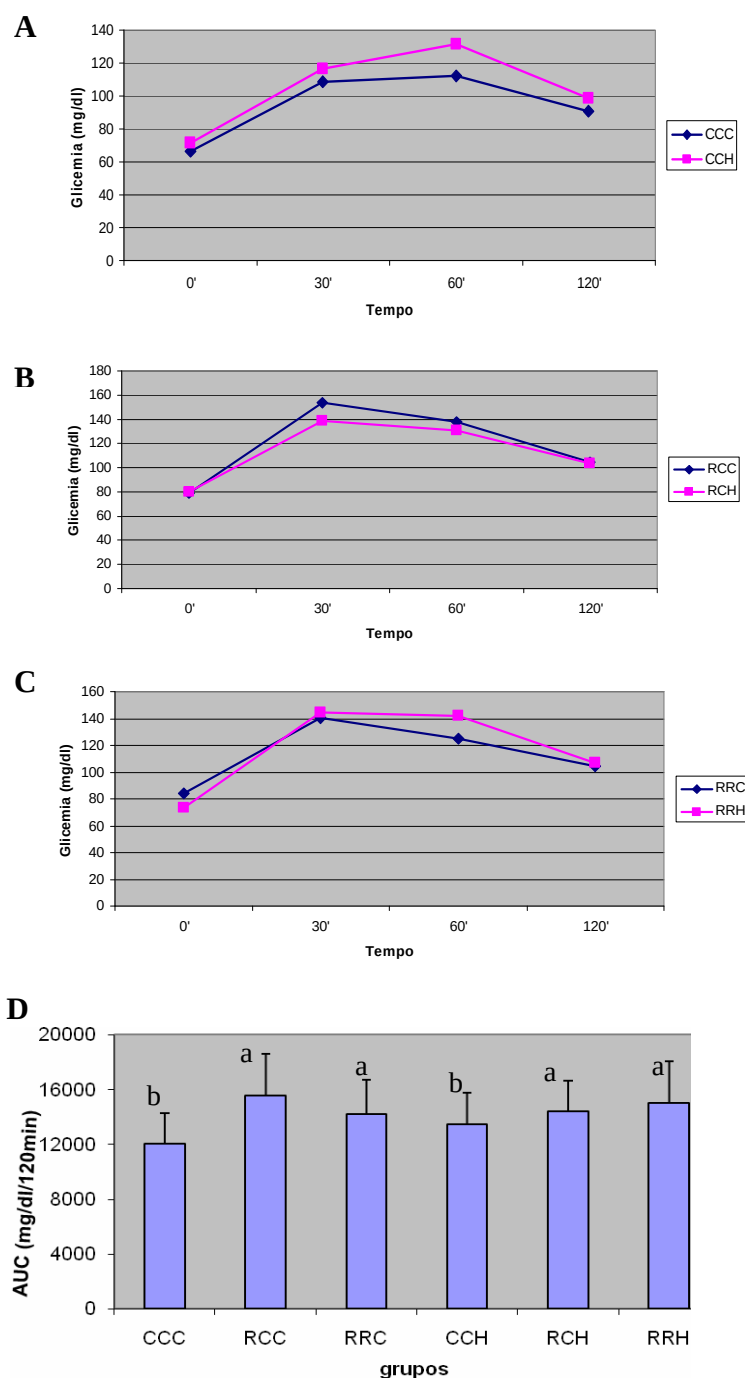


**Figura 2.** Teste de Tolerância à glicose de grupo de ratos de 16 semanas de idade que não sofreram restrição alimentar materna na gestação e lactação e receberam dieta controle (CCC) ou dieta hiperlipídica (CCH) pós-desmame (A); grupo de ratos de 16 semanas que sofreram restrição materna de 30% somente na gestação e receberam dieta controle (RCC) ou a dieta hiperlipídica (RCH) pós-desmame (B); grupo de ratos que sofreram restrição alimentar materna de 30% na gestação e na lactação e receberam dieta controle (RRC) ou hiperlipídica (RRH) após o desmame (C). Área total abaixo da curva glicêmica (AUC) de todos os grupos experimentais (D).

A alimentação materna não interferiu nos valores de glicose e lipídeos séricos (Tabela 13). A dieta hiperlipídica reduziu os valores de triglicerídeos e VLDL dos animais de 16 semanas ( $p<0,05$ ) (Tabela 13).

Não houve interação entre alimentação materna e dieta após desmame sobre peso de músculo sóleo e órgãos do trato gastrointestinal (Tabela 14). O peso do músculo sóleo não sofreu efeito nem da alimentação materna e nem de dieta pós-desmame.

A restrição alimentar de 30% das mães na gestação e lactação reduziu o peso de jejuno da prole ( $p<0,05$ ), mas não alterou o peso dos outros órgãos do trato digestório e a dieta hiperlipídica aumentou significativamente o peso do estômago, pâncreas, duodeno, jejuno e íleo da prole ao fim de 16 semanas de idade ( $p<0,05$ ) (Tabela 14).

A expressão gênica do transportador GLUT4 no tecido adiposo periepídimal e no músculo sóleo não apresentaram efeito de interação da alimentação materna e da dieta pós-desmame. Não houve efeito de alimentação materna e nem de dieta pós-desmame na expressão gênica do GLUT4 no músculo sóleo (Figura 3). Já no tecido adiposo foi observado um aumento da expressão gênica do GLUT4 ( $p<0,05$ ) nos filhos de mães que sofreram restrição na gestação e lactação, quando comparados com aqueles que passaram por restrição somente na gestação (Figura 3). A dieta hiperlipídica interferiu na expressão gênica do GLUT4 no tecido adiposo provocando aumento significativo na expressão deste transportador de glicose (Figura 3).

### **Discussão**

Atualmente, muitos estudos acerca do desenvolvimento da obesidade e de alterações metabólicas procuram respostas na hipótese da programação fetal. De fato, a nutrição desbalanceada das mães durante a gestação afeta, a longo prazo, sua prole e a capacidade do feto de se adaptar à restrição de nutrientes altera todo o seu metabolismo, e essa nova situação pode ser responsável por algumas doenças na vida adulta (McMILLEN e ROBINSON, 2005; WILLIAM, 2006; BARKER, 2007).

Um menor peso ao nascer observado, neste estudo, na prole de mães que sofreram restrição alimentar de 30% na gestação está em concordância com os achados de Vickers et al. (2000) e Howie et al. (2012).

**Tabela 14.** Comparação entre as médias±desvio padrão do peso dos órgãos do trato gastrointestinal (%) e músculo sóleo (%) em animais com 16 semanas de idade.

|                      |   | Valores de P            |                         |                         |                                         |                                       |                                 |
|----------------------|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Grupo                |   | CC                      | RC                      | RR                      | Efeito da<br>alimentação<br>materna (R) | Efeito da dieta<br>pós-desmame<br>(D) | Efeito da<br>interação<br>(RxD) |
| Músculo Sóleo (%)    | C | 0,03±0,03               | 0,04±0,02               | 0,05±0,01               |                                         |                                       |                                 |
|                      | H | 0,05±0,02               | 0,05±0,01               | 0,05±0,01               | 0,586                                   | 0,973                                 | 0,465                           |
| Estômago (%)         | C | 0,39±0,04 <sup>B</sup>  | 0,41±0,03 <sup>B</sup>  | 0,42±0,04 <sup>B</sup>  |                                         |                                       |                                 |
|                      | H | 0,45±0,09 <sup>A</sup>  | 0,42±0,04 <sup>A</sup>  | 0,46±0,03 <sup>A</sup>  | 0,301                                   | 0,007                                 | 0,392                           |
| Pâncreas (%)         | C | 0,36±0,06 <sup>B</sup>  | 0,31±0,08 <sup>B</sup>  | 0,36±0,05 <sup>B</sup>  |                                         |                                       |                                 |
|                      | H | 0,40±0,05 <sup>A</sup>  | 0,42±0,05 <sup>A</sup>  | 0,41±0,09 <sup>A</sup>  | 0,622                                   | 0,001                                 | 0,333                           |
| Fígado (%)           | C | 3,94±0,41               | 3,64±0,35               | 3,57±0,34               |                                         |                                       |                                 |
|                      | H | 3,69±0,40               | 3,76±0,24               | 3,68±0,21               | 0,274                                   | 0,939                                 | 0,207                           |
| Duodeno (%)          | C | 0,30±0,06 <sup>B</sup>  | 0,31±0,10 <sup>B</sup>  | 0,37±0,07 <sup>B</sup>  |                                         |                                       |                                 |
|                      | H | 0,36±0,11 <sup>A</sup>  | 0,40±0,10 <sup>A</sup>  | 0,40±0,11 <sup>A</sup>  | 0,336                                   | 0,028                                 | 0,644                           |
| Jejuno (%)           | C | 1,73±0,22 <sup>ab</sup> | 1,60±0,10 <sup>ab</sup> | 1,46±0,29 <sup>bb</sup> |                                         |                                       |                                 |
|                      | H | 2,03±0,30 <sup>ab</sup> | 1,82±0,30 <sup>ab</sup> | 1,84±0,21 <sup>ba</sup> | 0,034                                   | <0,001                                | 0,665                           |
| Íleo (%)             | C | 0,26±0,05 <sup>B</sup>  | 0,21±0,10 <sup>B</sup>  | 0,27±0,06 <sup>B</sup>  |                                         |                                       |                                 |
|                      | H | 0,25±0,06 <sup>A</sup>  | 0,30±0,06 <sup>A</sup>  | 0,31±0,07 <sup>A</sup>  | 0,286                                   | 0,036                                 | 0,164                           |
| Intestino Grosso (%) | C | 0,74±0,05               | 0,73±0,10               | 0,77±0,09               |                                         |                                       |                                 |
|                      | H | 0,76±0,10               | 0,76±0,07               | 0,75±0,06               | 0,916                                   | 0,673                                 | 0,672                           |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação; C = dieta controle; H = dieta hiperlipídica (n=8/ grupo experimental).

<sup>a, b</sup> Médias ± desvio padrão na linha seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

<sup>A, B</sup> Médias ± desvio padrão na coluna seguidas de letras maiúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

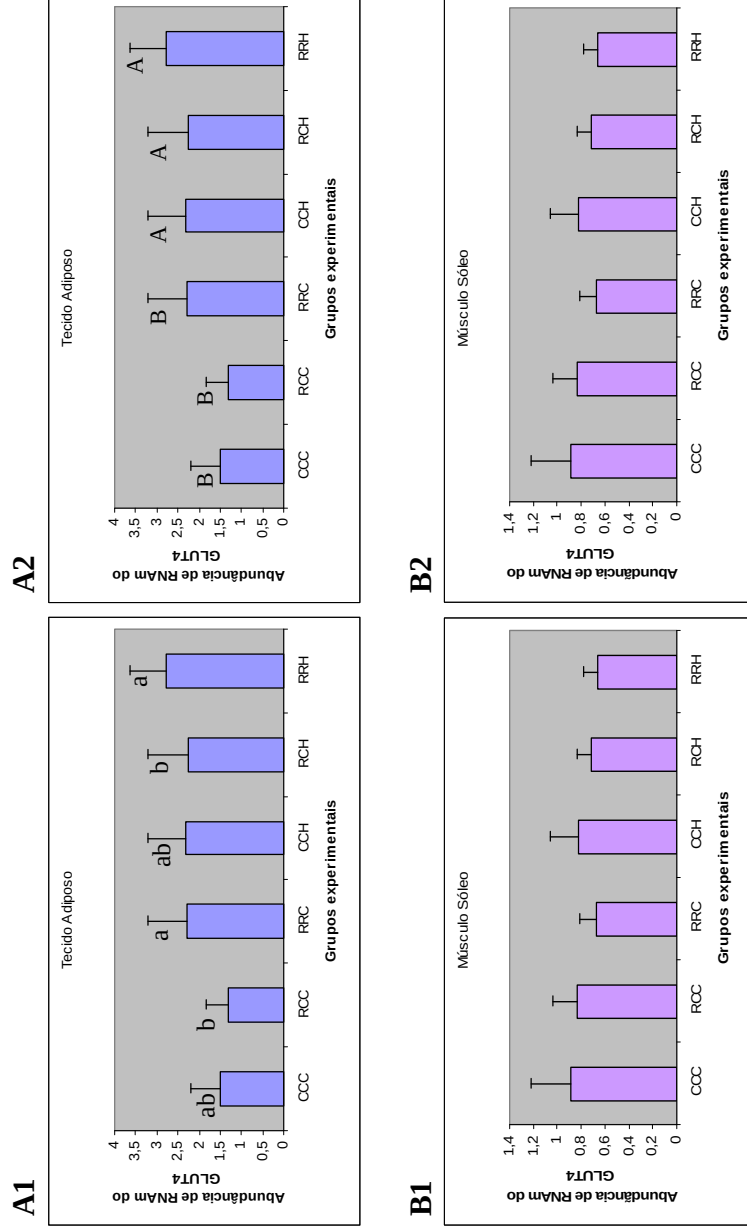


**Figura 3.** Abundância de RNAm do GLUT4 no tecido adiposo periepidual sob influência da restrição nutricional materna (A1) e da dieta após desmame (A2) e abundância de RNAm do GLUT4 no músculo sóleo sob influência da restrição nutricional materna (B1) e dieta após desmame (B2) em ratos com 16 semanas de idade filhos de mães que receberam alimentação *ad libitum* na gestação e lactação e que após o desmame receberam dieta controle (CCC) ou dieta hipercalórica (CCH); filhos de mães que receberam alimentação *ad libitum* na gestação e foram restritas na lactação e que após o desmame receberam dieta controle (RCC) ou dieta hipercalórica (RCH); e filhos de mães que receberam alimentação *ad libitum* na gestação e lactação e que após o desmame receberam dieta controle (RRH) ou dieta hipercalórica (RRH).

A restrição alimentar na gestação e lactação induziu significativa redução no peso corpóreo da prole ao desmame (grupo RR) assim como no ganho de peso desses animais o que pode ser explicado, em parte, pela quantidade e qualidade do leite materno. De fato, estudos mostram que a nutrição inadequada das mães nessa fase compromete a composição de seu leite, podendo levar ao menor desenvolvimento da ninhada (TIMOFEEVA et al., 1999; BAUTISTA et al., 2008; COUPÉ et al., 2009).

A ingestão de leite com sua quantidade comprometida deve estar associada a um menor desenvolvimento de órgãos e tecidos da prole. No presente estudo, foi observado maior peso relativo de estrutura do trato gastrointestinal, como o estômago, jejuno e intestino grosso. Em camundongos restritos em 30% do alimento e em aves alimentadas com dietas de baixa caloria foram observados um aumento no peso absoluto desse órgão (KRISTAN e HAMMOND, 2001; STARCK e RAHMAAN, 2003) e os autores consideram que a função de armazenamento exercida pelo estômago foi preservada para permitir um rápido retorno da ingestão em quantidades maiores, após períodos de restrição. Outros estudos, no entanto, mostraram pesos menores de órgãos do trato digestório em consequência da restrição materna (YOUNG et al., 1987, WEAVER et al., 1998, WANG et al., 2005).

Os ratos filhos de mães restritas apenas na gestação apresentaram crescimento compensatório, do nascimento ao desmame. O aumento no tecido adiposo visceral, com consequente aumento na gordura corporal total e índice de adiposidade devem ter contribuído com o ganho de peso compensatório, como observado por Howie et al. (2012) que mostraram aumento na gordura corporal total em animais desmamados provenientes de mães que sofreram restrição nutricional de 30% somente na gestação. Esses pesquisadores também observaram aumento da massa óssea nesse estudo. Assim, podemos inferir que essa compensação no peso corpóreo dos animais RC está relacionada com maior deposição de gordura nas vísceras e, provavelmente, aumento de massa óssea, embora não avaliado pelo presente estudo.

No presente estudo, a restrição alimentar das mães não provocou hiperfagia nos animais após desmame até o início da vida adulta (3-16 semanas de idade), diferentemente do observado por Vickers et al. (2000) que foram os primeiros a demonstrar que a hiperfagia é uma consequência da programação fetal. Os animais que sofreram restrição,

especialmente aqueles que foram restritos na gestação e lactação, geraram ratos que não apresentaram aumento na deposição de gordura e no peso corpóreo no início da fase adulta, o que pode ser parcialmente explicado pela ausência de hiperfagia.

Estes resultados sugerem que o controle hipotalâmico da ingestão de alimento não deve ter sido alterado nos animais que sofreram restrição na vida intrauterina, uma vez que a ingestão de alimentos foi menor para aqueles animais que receberam dieta hiperlipídica. No entanto, a ingestão energética foi semelhante entre os grupos controle e hiperlipídico, evidenciando que os animais regularam a sua ingestão de acordo com o nível energético da dieta, atingindo a saciedade com o consumo menor de dieta hipercalórica.

Por outro lado, deve ser considerada a idade do animal utilizado no presente estudo. Desai et al. (2007) encontraram obesidade e resistência à insulina como resultado da restrição de nutrientes durante a gestação em animais mais velhos (nove meses de idade) do que os utilizados no presente estudo, que se encontravam no início da fase adulta (quatro meses de idade). Assim, não pode ser descartada a hipótese do aparecimento de uma hiperfagia mais tardia nos animais.

Estudos anteriores mostraram que o baixo peso ao nascimento predispõe ao risco aumentado de diabetes tipo II (HALES e BARKER, 1992) e a tolerância à glicose começa a declinar a partir dos 12 meses de idade, em ratos (MURPH et al., 2003). No presente estudo, os maiores valores de área total abaixo da curva glicêmica na restrição na gestação e/ou lactação sugerem redução na utilização periférica de glicose em animais adultos. A desnutrição fetal reduz a sensibilidade das fibras musculares à insulina, provocando diminuição do tecido muscular esquelético e aumento do tecido adiposo, com baixos níveis de GLUT4, proteína transportadora de glicose em ambos os tecidos (SEVILLA et al., 1997; MARTINS, 2010). Além disso, a restrição alimentar durante a gestação ou imediatamente após o nascimento promove redução da massa muscular esquelética (McMILLEN e ROBINSON, 2005), que parece estar relacionada com mudanças na expressão de genes associados ao processo de crescimento muscular (BAYOL et al., 2004; GICQUEL et al., 2008). No músculo esquelético e cardíaco e no tecido adiposo, a insulina tem um papel crítico no transporte de glicose ao estimular a translocação de GLUT4 do meio intracelular à membrana celular (SHEPHERD e KAHN, 1999).

O transporte transmembrana de glicose pelo GLUT4, proteína transportadora de glicose dependente de insulina, é um passo limitante para o metabolismo de glicose no tecido muscular e adiposo. Comparando a necessidade de utilização de glicose entre estes tecidos, estudos têm revelado que o músculo esquelético é considerado o principal local de captação de glicose estimulado pela insulina, enquanto que o tecido adiposo capta menor quantidade de glicose sob condições normais (DEFROZO, 1997). A expressão deste transportador de glicose parece ser diferentemente regulada nestes tecidos. Desta forma, na fase inicial do desenvolvimento da obesidade ocorre aumento na expressão do RNAm do GLUT4 no tecido adiposo seguido por redução, com consequente diminuição na captação e uso de glicose, levando ao aparecimento de resistência à insulina. De fato, estudos em camundongos mostraram que inicialmente a expressão do GLUT4 encontra-se aumentada no tecido adiposo, no entanto, ao longo do tempo, quando a obesidade já está bem estabelecida, foi observada uma redução na expressão do RNAm da proteína GLUT4 tanto no tecido adiposo quanto no músculo esquelético (PAPA et al., 2002). No estado de resistência à insulina, a reduzida captação e utilização de glicose nestes tecidos está associada à diminuição na expressão do GLUT4 (JEANRENAUD et al., 1985).

No presente estudo, o aumento da expressão gênica do GLUT4 no tecido adiposo periepídídimo observado dos animais no início da idade adulta que sofreram restrição alimentar materna na gestação e lactação, é indicativo de uma alta capacidade tecidual de captação de glicose. A oferta de alimento com alto teor de lipídeos provocou aumento da expressão gênica deste transportador de glicose no tecido adiposo periepídídimo. Estes resultados indicam que, na idade em que ocorreu o sacrifício dos animais, este tecido poderia estar desenvolvendo um mecanismo compensatório que iria favorecer uma futura deposição de gordura. Pressupõe-se que este mecanismo pode ter sido programado na fase inicial de sua vida quando sua mãe estava sob restrição calórica. Embora não tenha sido observado aumento na adiposidade no início da fase adulta neste estudo, é bem provável que uma maior deposição de gordura ocorresse com o avanço da idade do animal, principalmente nos animais cujas mães sofreram restrição na gestação e lactação (RRC e RRH), uma vez que a expressão do RNAm do GLUT4 foi significativamente maior que aquela observada nos grupos que sofreram restrição alimentar materna somente na gestação (RCC e RCH).

No músculo sóleo, a expressão gênica do GLUT4 observada neste estudo foi ligeiramente menor nos animais que sofreram restrição alimentar materna na gestação e lactação e, embora essa redução não tenha sido significativa, pode ser indicativo do início de um estado de resistência à insulina, já que a área sob a curva glicêmica (AUC) observada nestes animais foi significativamente maior. É bem conhecido que os transportadores de glicose GLUT4 podem estar presentes tanto na membrana plasmática quanto no interior das células associados a vesículas. Na ausência de insulina a capacidade de captação de glicose é baixa, uma vez que grande parte das moléculas de GLUT4 ficam no meio intracelular associadas às vesículas (MARTIN et al., 1998), e estas vesículas estão associadas com o sequestro das moléculas de GLUT4 da membrana celular. A insulina ao ligar-se ao seu receptor de membrana estimula o transporte de glicose nestes tecidos por ativar o processo de translocação dos GLUT4 para a membrana celular, processo conhecido por exocitose (STÖCKLI et al., 2011). A diminuição na expressão gênica deste transportador de glicose reduziria o processo de translocação do GLUT4 do interior da célula para a membrana plasmática e consequentemente diminuiria a concentração de GLUT4 na membrana celular, prejudicando, desta forma, a entrada de glicose na célula. De fato, a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática é um processo intimamente dependente do conteúdo intracelular desta proteína transportadora (KERN et al., 1990; GULVE et al., 1997).

O aumento de gordura hepática observado no presente estudo, em animais adultos nascidos de mães com restrição alimentar moderada durante gestação e/ou lactação, é indicativo de efeito da restrição materna na fase de desenvolvimento fetal sobre este tecido. De fato, pode ser observado neste estudo menor peso relativo de fígado e acúmulo de gordura neste órgão ao desmame em animais cuja mãe sofreu restrição alimentar na gestação e lactação (grupo RR). Distúrbios no metabolismo hepático de glicose, assim como mudanças no metabolismo do colesterol, foram observados em ratos cujas mães receberam dietas com baixa proteína ou energia durante a gestação (GODFREY e BARKER, 2001), estão associados com alterações na circulação fetal, favorecendo o sistema nervoso central, e com isso, modificando o crescimento do fígado, afetando o metabolismo de lipídico e de glicose. De fato, a desnutrição fetal pode alterar

permanentemente o balanço de duas enzimas hepáticas, a fosfoenolpiruvato carboxilase e a glicoquinase, envolvidas na síntese e quebra da glicose respectivamente (BARKER, 1998).

A nutrição pobre em nutrientes na fase inicial da vida de um organismo, particularmente aquela com baixa proteína, pode causar retardo no crescimento e mudanças permanentes em órgãos chaves responsáveis pela homeostase de glicose na idade adulta (HALES e BARKER, 1992). A programação fetal do metabolismo de glicose na vida adulta pode operar parcialmente por meio de alterações e mudanças na expressão da enzima glicoquinase, reduzindo a sua atividade (BURNS et al., 1997).

A restrição calórica materna na gestação e/ou lactação, no presente estudo, não provocou alteração no teor de glicogênio hepático nos animais adultos. Estudos realizados por outros pesquisadores mostraram que a restrição proteica materna provocou alterações morfológicas e funcionais nos hepatócitos e uma redução no teor de glicogênio hepático em ratos adultos (MURPH et al., 2003). Esses autores associaram esta resposta a uma possível redução na expressão gênica da enzima glicoquinase, que tem como função favorecer a captação hepática de glicose, especialmente nos hepatócitos perivenosos. Estes efeitos, no entanto, foram observados mais tardiamente, quando os animais alcançaram a idade de 20 semanas. A determinação de glicogênio hepático, no presente estudo, foi realizada em ratos mais jovens, com 16 semanas de idade e é possível que alterações no metabolismo da glicose provocadas pela restrição calórica materna na fase perinatal (gestação e/ou lactação), se presentes, aparecessem em animais com idade maior que a utilizada neste estudo.

O consumo de dieta com alto teor de lipídios altera a síntese de glicogênio hepático, pois induz ao acúmulo de gordura no fígado, suprimindo a produção de glicose hepática. Essa diminuição na produção de glicogênio hepático, provavelmente se deve ao fato de que ácidos graxos de cadeia longa inibem a ação da enzima glicogênio sintetase (WITITSUWANNAKUL e KIM, 1977). De fato, Oakes et al. (1997) e Strackowski et al. (2001) observaram redução no estoque de glicogênio no fígado de animais que receberam dieta hiperlipídica. Samuel et al. (2004) observaram diminuição na ativação da glicogênio sintetase no fígado e aumento na gliconeogênese em animais tratados com dieta hiperlipídica. Neste trabalho, o estoque de glicogênio hepático foi reduzido nos animais que

receberam a dieta hiperlipídica, o que sugere que a maior quantidade de gordura na dieta interferiu na enzima glicogênio sintetase, diminuindo a produção de glicogênio.

A ingestão de dieta hiperlipídica, independente da restrição nutricional materna, provocou redução nos níveis plasmáticos de Triglicerídeos e VLDL, que pode estar associada a alterações no metabolismo hepático, uma vez que não houve maior deposição de gordura nos tecidos periféricos, como era esperado. Uma possível explicação para este resultado pode estar no alto teor de gordura da dieta hiperlipídica, cerca de 2,6 vezes maior, comparada com a dieta controle, que causaria algum dano no metabolismo hepático. Esta hipótese é melhor entendida se considerar os animais do grupo restrito, já que a restrição contribuiu para maior deposição de gordura no fígado. Nos animais controle, no entanto, a causa desta alteração não é bem compreendida.

Em conclusão, os resultados obtidos no presente estudo mostram que a restrição materna exerce efeito negativo, reduzindo o crescimento corpóreo, prejudicando o desenvolvimento de vários tecidos como fígado e trato gastrointestinal, resultando em alterações no metabolismo lipídico de glicose, gerando indivíduos adultos com maior propensão ao desenvolvimento de alterações metabólicas, como resistência à insulina. A dieta hiperlipídica pós-desmame não compensou os efeitos da restrição alimentar materna no período experimental, resultando em animais com menor peso corporal que os do grupo controle, no entanto, induziu modificações metabólicas hepáticas que representam um sinalizador clínico importante para a presença de resistência à insulina, mesmo na ausência da obesidade.

### **Referências:**

AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. **AIN-93G Growth purified diet**. 2010.

Acessado em 16 jun. 2011. Disponível em: <[www.testdiet.com](http://www.testdiet.com)>

AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. **AIN-93M maintenance purified diet**. 2011.

Acessado em 16 jun. 2011. Disponível em: <[www.testdiet.com](http://www.testdiet.com)>

BARKER, D.J.P. (1998). In utero programming of chronic disease. **Clinical Science**, v.95, p.115-128.

- BARKER, D.J.P. (2007). The origins of the developmental origins theory. **J. Intern. Med.**, v.261, p.412-7.
- BAUTISTA, C.J; BOECK, L.; LARREA, F.; NATHANIELSZ, P.W.; ZAMBRANO, E. (2008). Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. **Pediatric Research**, v. 63, p. 358-362.
- BAYOL, S.; et al. (2004). The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. **Br. J. Nutr.** v.91, p.331-339.
- BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. (1968). Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weaning and female adult rats with hypothalamic lesions. **J. Endoc.**, v. 40, p.527-8.
- BURNS, S.P; DESAI, M.; COHEN, R.D.; HALES, C.N.; ILES, R.A.; GERMAIN, J.P.; GOING, T.C.H.; BAILEY, R.A. (1997). Gluconeogenesis, glucose handling and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. **J. Clin. Invest.**, 100:1768-1774.
- CAMPOS, K.E.; SINZATO, Y.K.; PIMENTA, W.P.; RUDGE, M.V.C.; DAMASCENO, D.C. (2007). Effect of maternal obesity on diabetes development in adult rat offspring. **Life Sciences**, v. 81, p. 1473-78.
- COUPÉ, B.; GRIT, I.; DARMAUNS, D.; PARNET, P. (2009). The timing of “catch-up growth” affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. **American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v. 297, p. R813-R824.
- KRISTAN, D. M.; HAMMOND, K. A. (2001). Parasite infection and caloric restriction induce physiological and morphological plasticity. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, vol.281, p.502-510.
- DEFROZO, R.A. (1997). Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. **Diabetes Rev.** vol.5, p.171-269.
- DESAI, M., GAYLE, D.; BABU, J. ROSS, M.G. (2007) The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 196, p.555e1-555e7.

- FERNANDEZ-TWINN, D.S.; OZANNE, S.E. (2006). Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. **Physiology & Behavior**, v.88, p.234-243.
- FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. (1972). Estimation of concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.449-502.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509.
- GICQUEL, C.; EL-OSTA, A.; Le BOUC, Y. (2008). Epigenetic regulation and fetal programming. **Best practice & research. Clin. Endocrinol. Metabolism.**, v.22(1), p.1-16.
- GRAHAM, C. F. (1941). A device for the diagnosis of *Enterobius vermicularis*. **Am. J. Trop. Med.**, 21: 159 – 161.
- GODFREY, K.M.; BARKER, D.J.P. (2001). Fetal programming and adult health. **Public Health Nutrition**, v.4, n.2B, p.611±624.
- GULVE, E.A.; HENRIKSEN, E.J.; RODNICK, K.J.; YOUN, J.H.; HOLLOSZY, J.O. (1997). Glucose transporters and glucose transport in skeletal muscles of 1-to 25-month old rats. **American Journal of Physiology**, 264:E319-27.
- HALES, C.N.; BARKER, D.J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, 35(7):595–601.
- HOWIE, G.J.; SLOBODA, D.M.; VICKERS, M.H. (2012). Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sexspecific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p.298-307.
- JANSEN, G.R.; ZANETTI, M.E.; HUTCHISON, C.F. (1966). Studies in lipogenesis in vivo. Fatty acid and cholesterol synthesis during starvation and refeeding. **Biochem. J.**, v.101, n.3, p.811-8.
- JEANRENAUD, B.; HALIMI, S.; VAN DE WERVE G. (1985). Neuroendocrine disorders seen as triggers of the triad: obesity-insulinresistence-abnormal glucose tolerance. **Diabetes-Metabolism Research and Reviews**, v. 1, p. 261-291.

- KERN, M.; WELLS, J.A.; STEPHENS, J.M.; ELTON, C.W.; FRIEDMAN, J.E.; TAPSCOTT, E.B.; PEKALA, P.H.; DOHM, G.L. (1990). Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (GLUT4) protein level. **Biochemical Journal**, 270:397-400.
- KRISMAN, C.R. (1962). A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Anal. Biochem.**, v.4, p. 17-23.
- MARTIN-GRONERT, M.S.; OZANNE, S.E. (2005). Programming of appetite and type 2 diabetes. **Early Human Development**, v.81, p.981-988.
- MARTIN, L.B.; SHEWAN, A.; MILLAR, C.A.; GOULD, G.W.; JAMES, D.E. (1998). Vesicle-associated membrane protein 2 plays a specific role in the insulin-dependent trafficking of the facilitative glucose transporter GLUT 4 in 3T3-L1 adipocytes. **J. Biol. Chem.**, vol 273, p.1444-1452.
- MARTINS, R.M.A. (2010). **Origens fetais de doenças do adulto** – revisão etiopatogênica da doença mais investigada: diabetes mellitus tipo II. 2009. 34p. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Universidade do Porto, Portugal.
- McMILLEN, C.; ROBINSON, J.S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity and programming. **Physiology Reviews**, v.85, p.571-633.
- MURPHY, H.C.; REGAN, G.; BOGDARINA, I.G.; CLARK, A.J.L.; ILES, R.A.; COHEN, R.D.; HITMAN, G.A.; BERRY, C.L.; COADE, Z.; PETRY, C.J.; BURNS, S.P. (2003). Fetal programming of perivenous glucose uptake reveals a regulatory mechanism governing hepatic glucose output during refeeding. **Diabetes**, 52:1326-1332.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (1995). **Nutrient requirements of laboratory animals**. Washington D.C.: Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, National Academic Press, 4ª edição, 175p. Acessado em 16 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.nap.edu/catalog/4758.html>>
- NISSEN, P.M.; NEBEL, C.; OKSBJERG, N.; BERTRAM, H.C.. (2011) Metabolomics reveals relationship between plasma inositols and birth weight: possible markers for fetal programming of type 2 diabetes. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, vol/is.2011/1110-7243, p.1110-7251.

- OAKES, N.D.; COONEY, G.J.; CAMILLERI, S.; CHISHOLM, D.J.; KRAEGEN, E.W. (1997). Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. **Diabetes**, 46:1768-1774.
- PAPA, P.C.; VARGAS, A.M.; SILVA, J.L.T.; NUNES, M.T.; MACHADO, U.F. (2002). GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Sciences**, 71:1917-1928.
- PETRY, C.J.; DESAI, M.; OZANNE, S.E. & HALES, C.N. (1997). Early and latter nutritional Windows for diabetes susceptibility. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.56, p.233-242.
- PFAFFL, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v.29(9), p.2002-2007.
- RAO, R.K.; PADMAVATHI, I.J.N.; et al. (2012). Maternal micronutrient restriction programs the body adiposity, adipocyte function and lipid metabolism in offspring: a review. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 13, p.103-8.
- RINAUDO, P.; WANG, E. (2012). Fetal programming and metabolic syndrome. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 74, p.107–30.
- SAMUEL, V.T.; LIU, Z.X.; QU, X.; ELDER, B.D.; BILZ, S.; BEFROY, D.; ROMANELLI, A.J.; SHULMAN, G.I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, 32345-32353.
- SEKI, Y.; WILLIAMS, L.; VUGUIN, P.M.; CHARRON, M.J. (2012). Minireview: epigenetic programming of diabetes and obesity: animal models. **Endocrinology**, v. 153, p. 1031–1038.
- SEVILLA, L.; et al. (1997). Chronic high-fat feeding and middle-aging reduce in an additive fashion glut4 expression in skeletal muscle and adipose tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.235, p.89-93.
- SHEPHERD, P.R.; KAHN, B.B. (1999). Glucose transporters and insulin action: implications for insulin resistance and diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v.341, p.248–257.

- STARCK J. M., RAHMAAN G. H. A. (2003). Phenotypic flexibility of structure and function of the digestive system of japanese quail. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, 1887- 1897.
- STÖCKLI, J.; FAZAKERLEY, D.J.; JAMES, D.E. (2011) . GLUT4 exocytosis. **Journal of Cell Science**, v.124, p.4147-4159.
- STRACZKOWSKI, M.; KOWALSKA, I.; DZEIENIS-STRACZKOUSKA, S.; KINALSKI, M.; GORSKI, J.; KINALSKA, I. (2001). The effect of exercise training on glucose tolerance and skeletal muscle triacylglycerol content in rats fed with a high fat diet. **Diabetes & Metabolism**, 27(1):19-23.
- TAI, M.M. (1994). A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. **Diabetes care**, v. 17, n. 2, p. 152-4.
- TAYLOR, B.A.; PHILLIPS, S.J. (1996). Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. **Genomics**, v. 34, p. 389-398.
- TIMOFEEVA, N.M.; EGOROVA, V.V.; NIKITINA, A.A.; TEZWITOVA, N.N.; GORDOVA, L.A.; GRUSDKOV, A.A. (1999). Effect of protein deficiency in female rats diet during pregnancy and lactation on the activity of membranes and soluble forms of digestive enzyme in small intestine of the rat pups. **Russian Journal Physiology**, v. 85, p.1567-1573.
- VICKERS, M.H.; BREIER, B.H.; CUTFIELD, W.S; HOFMAN, P.L.; GLUCKMAN, P.D. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **American Journal of Endocrinology Metabolic**, v.279, p.E83-E87.
- VICKERS, M.H.; REDDY, S.; IKENASIO, B.A.; BREIER, B.H. (2001). Dysregulation of the adipoinular axis-a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. **Journal of endocrinology**, v. 170, p. 323-332.
- VICKERS, M.H.; BREIER, B.H.; MCCARTHY, D.; GLUCKMAN, P.D. (2003). Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.285, n.154-1, p. R271-R273.

- WANG, T.; HUO, Y. J.; SHI, F.; XU, R. J.; HUTZ, R. J. (2005). Effects of intrauterine growth retardation on development of the gastrointestinal tract in neonatal pigs. **Biology of the Neonate**, v.88,p. 66-72.
- WEAVER, L. T.; DESAI, M.; HALES, C. N. (1998). Effects of protein restriction in early life and function of the gastrointestinal tract of the rat. **J. Ped. Gast. Nut.**, v.27, p.53-559.
- WILLIAM, W.H. Jr. (2006). Recent observations on the regulation of fetal metabolism by glucose. **J. Physiol.**, 572(Pt 1):17-24.
- WILLIS, H.H. (1921). A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Med. J. Aust**, v.11, p. 375-376.
- WITITSUWANNAKUL, D.; KIM, K.H. (1977). Mechanism of palmityl coenzyme A inhibition of liver glycogen synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n.21, 7812-7817.
- YOUNG, C. M.; LEE, P. C.; LEBENTHAL, E. (1987). Maternal dietary restriction during pregnancy and lactation: effect on digestive organ development in suckling rats; **American J. Clin. Nut.**, v.46, p.4636-4640.

## **Capítulo III**

**Efeito da restrição alimentar materna e dieta  
hiperlipídica  
após desmame na atividade das enzimas digestivas de  
ratos**

## **EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR MATERNA E DIETA HIPERLIPÍDICA APÓS DESMAME NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DE RATOS**

### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da restrição alimentar materna na gestação e/ou lactação sobre a atividade das enzimas digestivas em ratos machos adultos alimentados com dieta hiperlipídica (H) ou dieta padrão (C) após o desmame (3-16 semanas de idade). Ratos machos nascidos de mães alimentadas *ad libitum* (controle) ou que sofreram restrição calórica de 30% (restrito) durante a gestação e/ou lactação foram distribuídos em seis grupos experimentais: CCC (provenientes de mães alimentadas com dieta C na gestação e lactação, com dieta C após desmame); CCH (provenientes de mães alimentadas com dieta C na gestação e lactação, com dieta H após desmame); RCC (provenientes de mães restritas na gestação e controle na lactação, com dieta C após desmame); RCH (provenientes de mães restritas na gestação e controle na lactação, com dieta H após desmame); RRC (provenientes de mães restritas na gestação e lactação, com dieta C após desmame); RRH (provenientes de mães restritas na gestação e lactação, com dieta H após desmame). Nos animais de três e 16 semanas, foram avaliadas a atividade das enzimas sacarase, lactase, maltase, tripsina, quimiotripsina, lipase e amilase. Às três semanas de idade, a restrição nutricional materna reduziu a atividade da amilase e lipase, sem efeito sobre as dissacaridases. Às 16 semanas de idade, a dieta materna e a dieta após desmame apresentaram interação sobre a atividade das dissacaridases e lipase. A alimentação materna diminuiu a atividade das dissacaridases e reduziu a tripsina. A dieta hiperlipídica aumentou a atividade da lipase e reduziu a das dissacaridases e tripsina. Em conclusão, os resultados mostram que mudanças na atividade das enzimas digestivas podem ocorrer pela restrição alimentar materna na gestação e/ou lactação e que a dieta após o desmame tem importante papel na atividade dessas enzimas, amplificando os efeitos das condições nutricionais anteriores.

**Palavras-chave:** amilase, lipase, tripsina, quimiotripsina, dissacaridases

## EFFECT OF MATERNAL FOOD RESTRICTION AND HIGH FAT DIET POST-WEANING IN DIGESTIVE ENZYMES ACTIVITY OF RATS

### Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of moderate maternal food restriction during pregnancy and/or lactation on digestive enzyme activity in adult male rats fed high-fat (H) or standart (C) diet after weaning (3 to 16 weeks of age). Male rats born to dams fed *ad libitum* (control) or dams undernutrition to 30% of control throughout pregnancy or lactation were assigned to six groups: CCC (rats born to dams fed C diet during pregnancy and lactation, and fed C diet after weaning); CCH (rats born to dams fed C diet during pregnancy and lactation, and fed H diet after weaning); RCC (rats born to dams undernutrition to 30% during pregnancy, C diet during lactation, and fed C diet after weaning); RCH (rats born to dams undernutrition to 30% during pregnancy, C diet during lactation, and fed H diet after weaning); RRC (rats born to dams undernutrition to 30% during pregnancy and lactation, and fed C diet after weaning); RRH (rats born to dams undernutrition to 30% during pregnancy and lactation, and fed H diet after weaning). In animals with three and 16 weeks of age, we evaluated sucrase, lactase, maltase, trypsin, chymotrypsin, lipase, amylase enzymes activities. Three weeks of age, maternal food restriction reduced amylase and lipase activity, no effect on disaccharidases. 16 weeks of age, maternal and post-weaning diet showed interaction for disaccharidases and lipase activity. Maternal nutrition decreased disaccharidases activity and reduced trypsin. High-fat diet increased lipase activity and reduced disaccharidases and trypsin. In conclusion, results show that changes in the activity of digestives enzymes can occur by maternal food restriction on pregnancy and/or lactation and diet post-weaning has an important role in the activity of these enzymes, amplify effects of anterior nutritional situation.

**Keywords:** amylase, lipase, trypsin, chymotrypsin, disaccharidases

### **Introdução**

A desnutrição materna vêm sendo correlacionada com o desenvolvimento de diversas doenças no início da vida adulta da prole. Esta correlação foi denominada como “programação fetal”, e definida como alterações durante o desenvolvimento fetal que levam a respostas adaptativas que refletirão no início da vida adulta (DRAKE e WALKER, 2004; McMILLEN e ROBINSON, 2005; McARDLE, 2006; BARKER, 2007; LEANDRO et al., 2009). Estas respostas adaptativas podem acarretar em prejuízos no funcionamento e tamanho de órgãos e tecidos, assim determinando alterações na fisiologia normal do indivíduo, alterando, inclusive, a atividades das enzimas digestivas (GURMINI et al, 2005; TIMOFEEVA, 2008).

Em animais de gestação múltipla, a distribuição dos nutrientes pela placenta se dá de forma diferenciada entre os fetos, dependendo da sua distribuição dentro do útero. Assim, filhotes que nascem mais leves, refletem menor fornecimento de nutrientes pela placenta e podem apresentar fenótipos diferentes quando adultos (DESAI et al, 2007; NISSEN et al, 2011).

Essa readaptação do organismo, que sofre com o estresse ambiental intrauterino, leva a uma redistribuição dos nutrientes de forma compensatória para a proteção de órgãos e tecidos mais importantes para a manutenção da vida, como o cérebro, em detrimento de outros, resultando em órgãos como o fígado e outras vísceras com tamanhos menores e, conseqüentemente, alterando a secreção de hormônios envolvidos no crescimento corporal (BARKER, 1998; GODFREY e BARKER, 2001, GURMINI et al, 2005).

Além dessa diminuição dos órgãos e do peso corporal, esses animais também apresentam alteração na atividade de algumas enzimas do trato digestivo (TIMOFEEVA et al, 2001).

Segundo Timofeeva et al (2008), o potencial da expressão genética do feto é determinada pelo ambiente nutricional, que pode ser facilmente modificado e, desta forma, a dieta materna tem importante papel nesse transcriptoma.

Assim, a restrição nutricional materna gera prole com maior propensão ao desenvolvimento de obesidade e outras doenças e, além disso, o consumo de dieta hipercalórica na fase pós-natal pode amplificar os efeitos metabólicos anormais da desnutrição intrauterina (VICKERS et al, 2000; VICKERS et al, 2001; VICKERS et al,

2003). No entanto, há poucos estudos sobre a atividade das enzimas digestivas que correlacionam a desnutrição no período gestacional e lactacional com uma dieta com alto teor energético na fase pós-desmame.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de enzimas digestivas frente à restrição alimentar materna na gestação e lactação associada a uma dieta hiperlipídica após o desmame.

## **Material e Métodos**

### **Fase I - Mães**

#### ***Gestação***

Foram utilizadas 48 fêmeas primíparas de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com aproximadamente 16 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UNESP – Botucatu, para acasalamento aleatório poligâmico de duas fêmeas para um macho em cada caixa. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em biotério com controle do fotoperíodo (12h de luz) e a temperatura foi mantida em  $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Foi realizado um período de adaptação da entrada dos animais no biotério ao início do experimento de dois meses e durante esse período, tanto machos quanto fêmeas foram vermifugados com produto comercial com base de praziquantel, na dosagem de 20mg de suspensão por kg de peso vivo, após exame parasitológico com a metodologia de Willis (1921) e Graham (1941) para detecção de parasitas internos. Os animais que apresentaram exame parasitológico negativo após vermifugação foram utilizados neste estudo.

Na manhã seguinte ao acasalamento, os machos foram retirados e o diagnóstico de prenhez realizado por esfregaço vaginal, sendo que a presença de espermatozóides marcou o primeiro dia de gestação. Neste momento, as fêmeas foram transferidas para caixas individuais para formação dos grupos experimentais. Os animais, durante o período de acasalamento, foram alimentados com ração comercial padrão de biotério (Nuvilab CR-1®) e água *ad libitum*.

Durante o período de gestação as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais que diferiram quanto ao manejo alimentar, sendo um grupo controle (n=16), formado por ratas alimentadas *ad libitum* com dieta controle (Tabela 1) e um grupo restrito (n=32) com fêmeas alimentadas com restrição de 30% da quantidade oferecida ao grupo controle da dieta controle, provocando, desta forma, uma restrição calórico-proteica.

Após o nascimento, os filhotes foram pesados individualmente e o tamanho da ninhada registrado e ajustado para oito filhotes por fêmea (quatro machos e quatro fêmeas). Foram selecionados dois machos e duas fêmeas de maior peso e dois machos e duas fêmeas de menor peso corporal, que foram mantidos com a mãe até o final do período da lactação. Embora no presente estudo apenas ratos machos tenham sido utilizados, este procedimento foi adotado com o objetivo de manter a igualdade das proles. Os filhotes excedentes foram sacrificados por decapitação.

### ***Lactação***

Ao nascimento dos filhotes, as mães do grupo que sofreu restrição alimentar durante a gestação foram divididas aleatoriamente em dois tratamentos que diferiram quanto ao manejo alimentar. O grupo controle permaneceu recebendo o mesmo manejo alimentar do período gestacional. Desta maneira, durante a lactação, foram formados três grupos:

CC (controle/controlado, n=16) = mães alimentadas *ad libitum* durante a gestação e lactação;

RC (restrito/controlado, n=16) = mães submetidas à restrição alimentar de 30% durante a gestação e alimentadas *ad libitum* durante a lactação;

RR (restrito/restrito, n=16) = mães submetidas à restrição alimentar de 30% durante a gestação e lactação.

## **Fase II – Prole**

### ***Animais com três semanas de idade***

No momento do desmame (três semanas de idade), o macho de menor peso de cada prole foi separado e mantido em gaiola individual até atingir 16 semanas de idade, quando então foi sacrificado. Apenas o segundo macho de menor peso de cada prole foi sacrificado ao desmame. As fêmeas foram descartadas e sacrificadas em câmara de CO<sub>2</sub>.

### ***Animais com 16 semanas de idade***

Os filhotes machos de menor peso foram distribuídos em seis grupos (n=8):

CCC – ratos machos alimentados com dieta controle após desmame, provenientes de mães que receberam dieta controle na gestação e lactação;

CCH – ratos machos alimentados com dieta hiperlipídica após desmame, provenientes de mães que receberam dieta controle na gestação e lactação;

RCC – ratos machos alimentados com dieta controle após desmame, provenientes de mães que receberam dieta com restrição de 30% na gestação e dieta controle na lactação;

RCH – ratos machos alimentados com dieta hiperlipídica após desmame, provenientes de mães que receberam dieta com restrição de 30% na gestação e dieta controle na lactação;

RRC – ratos machos alimentados com dieta controle após desmame, provenientes de mães que receberam dieta com restrição de 30% na gestação e lactação;

RRH – ratos machos alimentados com dieta hiperlipídica após desmame, provenientes de mães que receberam dieta com restrição de 30% na gestação e lactação.

### **Metodologia Utilizada - Animais com três e 16 semanas de idade**

O sacrifício dos animais foi realizado no período da manhã, sem prévio jejum.

#### ***Enzimas intestinais***

No momento do sacrifício, o intestino delgado foi removido através de laparotomia mediana para análise de enzimas intestinais. Após sua coleta, este foi cortado nos seus primeiros 15cm, determinando o duodeno, os 15cm finais, o íleo, e a porção média, o jejuno. Apenas a porção do jejuno foi lavada em solução fisiológica gelada, pesada e acondicionada em frascos previamente identificados e estocados em nitrogênio líquido. A determinação da atividade das enzimas intestinais (lactase (EC 3.2. 1.23), sacarase (EC 3.2.1.48) e maltase (EC 3.2.1.20)) foi feita de acordo com o proposto por Dahlquist (1964), cujo método consiste, resumidamente, na determinação de glicose em alíquotas de homogeneizados constituídos por mucosa intestinal e água, incubadas com substratos apropriados (lactose, sacarose ou maltose). A glicose liberada durante a reação foi determinada pelo método de glicose-oxidase (Glicose enzimática – Laborlab).

#### ***Enzimas pancreáticas***

Por ocasião do sacrifício, o pâncreas foi retirado e armazenado em nitrogênio líquido para posterior análise de enzimas pancreáticas. As amostras foram descongeladas e homogeneizadas para determinação das enzimas tripsina (EC 3.4.4.4), quimiotripsina (EC 3.4.4.5), lipase (EC 3.1.1.3) e amilase (EC 3.2.2.1.1).

A atividade das enzimas pancreáticas foi determinada após o pâncreas ser homogeneizado em solução tampão 50 mM Tris-HCl em pH 8,0 contendo CaCl<sub>2</sub> 50 mM na proporção de 1/20. Para a ativação do tripsinogênio foi adicionada enteroquinase no homogeneizado. A atividade da tripsina então foi medida por hidrólise de p-nitroaniline

benzoyl-DL-arginine-(BAPNA) em pH 8.2 (KAKADE et al.,1974). A atividade foi expressa em nmol p-nitroaniline liberada por minuto. Um método similar foi utilizado para a determinação da quimiotripsina (ERLANGER et al., 1966), sendo o BAPNA substituído pelo N-glutaryl-L-phenylalanine-p-nitroanilide (GAPNA). A reação foi interrompida com solução de ácido acético 3%.

A atividade da amilase foi determinada pelo método iodométrico (Amilase, Analisa) e a atividade da lipase foi obtida por um método colorimétrico (Lipase, Analisa).

### Dietas

As dietas utilizadas durante o período experimental foram formuladas pelo programa Super Crac 5.7 Windows – versão Máster, de acordo com as recomendações do NRC (1995) e AIN-93. Ambas as dietas foram preparadas pela PragSoluções (Jaú, SP). A composição das rações está descrita na tabela 1 e os valores da análise bromatológica na tabela 2.

**Tabela 1.** Composição das rações controle e hiperlipídica.

| Dieta Controle                        |                | Dieta Hiperlipídica                   |                |
|---------------------------------------|----------------|---------------------------------------|----------------|
| Ingrediente                           | Quantidade (%) | Ingrediente                           | Quantidade (%) |
| Milho (grão)                          | 46,80          | Milho (grão)                          | 34,04          |
| Farelo de Soja 45%                    | 30,50          | Farelo de Soja 45%                    | 0,00           |
| Soja integral tostada                 | 10,00          | Soja integral tostada                 | 49,90          |
| Farelo de Trigo                       | 2,00           | Farelo de Trigo                       | 2,00           |
| Gordura de suínos                     | 5,50           | Gordura de suínos                     | 5,00           |
| Óleo de Soja                          | 1,00           | Óleo de Soja                          | 4,78           |
| Açúcar                                | 2,00           | Açúcar                                | 2,00           |
| Supl. Vitamínico-mineral <sup>1</sup> | 1,00           | Supl. Vitamínico-mineral <sup>1</sup> | 1,00           |
| DL-metionina                          | 0,03           | DL-metionina                          | 0,03           |
| L-lisina HCl                          | 0,01           | L-lisina HCl                          | 0,01           |
| Calcário                              | 0,82           | Calcário                              | 0,87           |
| Sal comum                             | 0,30           | Sal comum                             | 0,30           |
| BHT                                   | 0,10           | BHT                                   | 0,10           |

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico-mineral (PragSoluções®). Nível de inclusão por Kg de suplemento: ácido nicotínico 0,300%; pantotenato de cálcio 0,160%; piridoxina HCl 0,070%; Tiamina HCl 0,060%; Riboflavina 0,060%; ácido fólico 0,020%; biotina 0,002%; vitamina B12 0,250%; vitamina E 0,750%; vitamina A 0,040%; vitamina D3 0,000%; vitamina K3 0,030%; cloreto de colina 6,000%; inositol 1,100%; lisina 14,000%; metionina 14,000%; sulfato de potássio 4,078%; óxido de magnésio 1,932%; citrato de ferro 2,354%; carbonato de zinco 0,202%; carbonato de manganês 0,055%; carbonato cúprico 0,126%; iodato de potássio 0,116%; selenato de sódio 0,043%; para-molibdato de amônio 0,280%; meta silicato de sódio 0,508%; sulfato de cromo-potássio 0,963%; cloreto de lítio 0,609%; ácido bórico 2,853%; fluoreto de sódio 2,223%; carbonato de níquel 1,113%; vanadato de amônio 0,231%.

**Tabela 2.** Valores de análise bromatológica das rações controle e hiperlipídica.

| <b>Ração</b>  | <b>MS<sup>1*</sup></b><br><b>(%)</b> | <b>PB<sup>2*</sup></b><br><b>(%)</b> | <b>EE<sup>3*</sup></b><br><b>(%)</b> | <b>CINZAS<sup>4*</sup></b><br><b>(%)</b> | <b>FB<sup>4*</sup></b><br><b>(%)</b> | <b>ENN<sup>5†</sup></b><br><b>(%)</b> | <b>EB<sup>6**</sup></b><br><b>(Kcal/Kg)</b> |
|---------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|
| Controle      | 95,42                                | 22,95                                | 10,67                                | 3,88                                     | 3,15                                 | 54,77                                 | 4559                                        |
| Hiperlipídica | 92,69                                | 22,71                                | 26,10                                | 3,72                                     | 3,20                                 | 36,96                                 | 5134                                        |

<sup>1</sup>Matéria Seca; <sup>2</sup>Proteína Bruta; <sup>3</sup>Extrato Etéreo; <sup>4</sup>Fibra Bruta; <sup>5</sup>Extrativo Não Nitrogenado; <sup>6</sup>Energia Bruta. \*Resultados expressos em 100% de MS<sup>1</sup>, Laboratório de Bromatologia-Departamento de Nutrição e Melhoramento Animal-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP, campus de Botucatu/SP; \*\*Valores de EB<sup>5</sup> expressos na 2ª MS<sup>1</sup>, Laboratório de Nutrição Animal-Departamento de Zootecnia-Faculdade de Ciências Agrárias-UNESP, campus de Jaboticabal/SP. †ENN=100-[(100-%MS)+%PB+%EE+%FB+%CINZAS]

### **Análise Estatística**

A análise estatística dos dados foi feita com o auxílio do software Minitab 16. Os dados obtidos dos animais com três semanas de idade foram analisados pela análise de variância sendo complementado pelo teste de Dunnett, com nível de significância de 5%, avaliando a diferença dos grupos restrito somente na gestação e restrito na gestação e lactação com o grupo controle. Já os dados de animais com 16 semanas de idade foram analisados por meio de análise de variância e complementada pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%, em esquema fatorial de 3x2, sendo três níveis de alimentação na gestação e lactação (*ad libitum*, restrito somente na gestação e restrito na gestação e lactação) e dois níveis de dieta após o desmame (dieta controle e hiperlipídica).

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências de Botucatu (processo nº 338/2011-CEEA).

### **Resultados**

A atividade das enzimas intestinais, nos animais de três semanas de idade, não apresentou diferença entre os grupos restritos com o controle ( $P>0,05$ ) (Tabela 3).

Ao analisar as enzimas pancreáticas observou-se que o grupo RR apresentou menor atividade da amilase ( $p<0,05$ ) e maior atividade da lipase ( $p<0,05$ ) quando comparado ao grupo CC (Tabela 4). O grupo RC teve um aumento na atividade da lipase e da quimiotripsina ( $p<0,05$ ) em comparação ao grupo CC (Tabela 4).

**Tabela 3.** Comparação entre as médias±desvio padrão da atividade das enzimas intestinais (unidades/mg de tecido) em ratos com três semanas de idade.

|          | CC         | RC         | RR         |
|----------|------------|------------|------------|
| Sacarase | 0,229±0,18 | 0,344±0,24 | 0,289±0,19 |
| Lactase  | 0,159±0,13 | 0,209±0,14 | 0,132±0,09 |
| Maltase  | 0,652±0,36 | 0,898±0,37 | 0,874±0,25 |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação (n=16/ grupo experimental).

Médias ± desvio padrão\* indica diferença com o grupo CC pelo teste Dunnett, ao nível de 5% de significância.

**Tabela 4.** Comparação entre as médias±desvio padrão da atividade das enzimas pancreáticas (unidades/mg de tecido) em ratos com três semanas de idade.

|                | CC         | RC          | RR          |
|----------------|------------|-------------|-------------|
| Amilase        | 2,773±0,63 | 3,012±0,44  | 2,005±0,42* |
| Lipase         | 0,066±0,01 | 0,123±0,03* | 0,108±0,03* |
| Tripsina       | 7,258±1,29 | 8,080±1,88  | 8,565±1,34  |
| Quimiotripsina | 3,473±0,57 | 4,266±0,72* | 3,830±0,91  |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação (n=16/ grupo experimental).

Médias ± desvio padrão\* indica diferença com o grupo CC pelo teste Dunnett, ao nível de 5% de significância.

Nos animais adultos foi observada interação do efeito da alimentação materna e da dieta pós-desmame ( $p<0,05$ ) para a atividade específica das enzimas digestivas sacarase e maltase (Tabela 5).

A restrição alimentar materna reduziu a atividade específica das enzimas sacarase e maltase ( $p<0,05$ ), assim como a dieta hiperlipídica pós-desmame diminuiu a atividades destas enzimas ( $p<0,05$ ) (Tabela 5).

O grupo CCC apresentou maior atividade da sacarase em comparação aos demais grupos. No entanto, foi possível observar que a atividade desta enzima foi menor nos grupos que receberam dieta hiperlipídica (CCH, RCH e RRH) em comparação aos animais dos grupos controles (CCC, RCC e RCH). Já a maltase apresentou maior atividade no grupo CCC seguido do grupo RCC. A menor atividade desta enzima foi observada em animais do grupo RRH, enquanto que os grupos RRC, CCH e RCH apresentaram valores semelhantes aos grupos RCC e RRH.

**Tabela 5.** Comparação entre as médias±desvio padrão da atividade das enzimas intestinais (unidades/mg de tecido) em ratos com 16 semanas de idade.

|           |       | Valores de p             |                          |                          |                                         |                                       |                                 |
|-----------|-------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
|           | Grupo | CC                       | RC                       | RR                       | Efeito da<br>alimentação<br>materna (R) | Efeito da dieta<br>pós-desmame<br>(D) | Efeito da<br>interação<br>(RxD) |
| Sacarase* | C     | 0,015±0,01 <sup>A</sup>  | 0,006±0,00 <sup>B</sup>  | 0,004±0,00 <sup>B</sup>  | 0,001                                   | <0,001                                | 0,017                           |
|           | H     | 0,003±0,00 <sup>B</sup>  | 0,002±0,00 <sup>B</sup>  | 0,001±0,00 <sup>B</sup>  |                                         |                                       |                                 |
| Maltase*  | C     | 0,065±0,03 <sup>A</sup>  | 0,024±0,00 <sup>B</sup>  | 0,013±0,00 <sup>BC</sup> | <0,001                                  | <0,001                                | <0,001                          |
|           | H     | 0,008±0,00 <sup>BC</sup> | 0,009±0,00 <sup>BC</sup> | 0,006±0,00 <sup>C</sup>  |                                         |                                       |                                 |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação; C = dieta controle; H = dieta hiperlipídica (n=8/ grupo experimental).

<sup>a,b</sup>Médias ± desvio padrão na linha seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

<sup>A, B</sup>Médias ± desvio padrão na coluna seguidas de letras maiúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

\* Letras representam o resultado da interação.

Não houve efeito da interação entre alimentação materna e dieta pós-desmame sobre a atividade específica das enzimas pancreáticas, exceto a lipase que apresentou interação devido à influência da dieta após desmame ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6).

A maior atividade da lipase foi observada no grupo CCH. O grupo RRH apresentou atividade da lipase semelhante ao do grupo CCH e RCC, sendo que este último mostrou uma atividade enzimática semelhante a observada nos grupos RCH, RRC e CCC.

A restrição de alimentos durante a gestação e lactação diminuiu a atividade da tripsina ( $p < 0,05$ ), mas não alterou a atividade das enzimas amilase, lipase e quimiotripsina em animais com 16 semanas de idade (Tabela 6). A dieta hiperlipídica após desmame aumentou a atividade da lipase ( $p < 0,05$ ), mas não influenciou a atividade das outras enzimas pancreáticas (Tabela 6).

### **Discussão**

Os resultados do presente estudo mostraram que a restrição alimentar materna durante a gestação e/ou lactação provocou mudanças a curto e longo prazo na atividade de enzimas digestivas, enquanto que a dieta hiperlipídica pós-desmame promoveu mudanças apenas na atividade das dissacaridases intestinais, tripsina e lipase pancreática em animais com 16 semanas.

Animais filhos de mães que sofreram restrição de nutrientes durante o período de gestação e lactação apresentaram menor atividade específica da enzima amilase com três semanas de idade mas não com 16 semanas de idade. Sabe-se que a função pancreática está estreitamente relacionada com o estado nutricional do organismo (BRANNON, 1990; HARADA, 1990). De fato, a atividade da amilase pancreática pode ser afetada por vários fatores, incluindo desnutrição (WEBSTER et al, 1972; NAGY et al., 1989), alimentos com deficiência em hidratos de carbono, dieta rica em gordura (CORRING, 1980) e diabetes (YEGNESWARAN e PITCHUMONI, 2010; NAKAJIMA et al., 2011).

A menor atividade da amilase observada neste estudo pode ter ocorrido devido à diminuição na síntese da enzima ou mesmo ao aumento da degradação da mesma.

**Tabela 6.** Comparação entre as médias±desvio padrão da atividade das enzimas pancreáticas (unidades/mg de tecido) em ratos com 16 semanas de idade.

|                |       | Valores de p              |                           |                          |                                         |                                       |                                 |
|----------------|-------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
|                | Grupo | CC                        | RC                        | RR                       | Efeito da<br>alimentação<br>materna (R) | Efeito da dieta<br>pós-desmame<br>(D) | Efeito da<br>interação<br>(RxD) |
| Amilase        | C     | 6,893±1,08                | 7,322±1,4                 | 7,299±0,78               |                                         |                                       |                                 |
|                | H     | 6,712±1,15                | 6,075±0,56                | 7,485±1,29               | 0,230                                   | 0,306                                 | 0,152                           |
| Lipase*        | C     | 0,644±0,07 <sup>C</sup>   | 0,839±0,12 <sup>BC</sup>  | 0,767±0,12 <sup>C</sup>  |                                         |                                       |                                 |
|                | H     | 1,150±0,22 <sup>A</sup>   | 0,796±0,03 <sup>C</sup>   | 1,026±0,06 <sup>AB</sup> | 0,169                                   | <0,001                                | <0,001                          |
| Tripsina       | C     | 8,784±1,96 <sup>abA</sup> | 10,170±1,80 <sup>aA</sup> | 8,708±1,50 <sup>bA</sup> |                                         |                                       |                                 |
|                | H     | 8,591±1,26 <sup>abB</sup> | 7,914±1,49 <sup>aB</sup>  | 6,376±1,08 <sup>bB</sup> | 0,046                                   | 0,006                                 | 0,206                           |
| Quimiotripsina | C     | 7,335±1,60                | 9,005±1,61                | 8,531±1,52               |                                         |                                       |                                 |
|                | H     | 7,218±0,71                | 7,485±1,46                | 8,719±1,11               | 0,077                                   | 0,312                                 | 0,281                           |

CC = alimentação *ad libitum* na gestação e lactação; RC = restrição alimentar 30% na gestação e alimentação *ad libitum* na lactação; RR = restrição alimentar de 30% na gestação e lactação; C = dieta controle; H = dieta hiperlipídica (n=8/ grupo experimental).

<sup>a,b</sup>Médias ± desvio padrão na linha seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste F (p<0,05)

<sup>A, B</sup>Médias ± desvio padrão na coluna seguidas de letras maiúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste F (p<0,05)

\* Letras representam o resultado da interação.

Considerando que a atividade desta enzima é dependente dos níveis de glicose circulantes, é possível que a redução de sua atividade, observada nos animais de três semanas, conforme apresentado no capítulo II, tenha sido causada pela diminuição dos níveis glicêmicos. De fato, Nagy et al (1989) sugerem que os níveis circulantes de glicose podem estar relacionados com a redução da atividade da amilase em animais submetidos a jejum.

As variações na atividade das enzimas digestivas frente à restrição de nutrientes são grandes, uma vez que cada enzima tem a sua própria síntese e uma composição de aminoácidos diferente mesmo em condições nutricionais adequadas (VANDERMEERS, 1968 citado por KHEROUA e BELLEVILLE, 1981). Desta forma, a amilase que é a enzima pancreática mais abundante, é mais afetada em situações de restrição de nutrientes, como a restrição calórico-proteica realizada neste estudo, uma vez que esta enzima precisa de mais aminoácidos para a sua síntese (KHEROUA e BELLEVILLE, 1981). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos com ratos submetidos à redução de fluxo sanguíneo materno fetal (NICHOLL et al., 2008) e em ratos que consumiram dieta com restrição de proteínas (SARLES et al., 1987).

Ao avaliar a atividade da lipase pancreática, observou-se que animais filhos de mães que sofreram restrição de nutrientes durante a gestação e/ou lactação apresentaram aumento da atividade da lipase pancreática apenas ao desmame. Estes resultados também foram obtidos em animais submetidos à desnutrição na fase adulta (LÓPEZ et al., 1996; HODHOD et al., 2005), em animais recém nascidos que sofreram com insuficiência placentária durante a gestação (LEBENTHAL et al., 1980) e animais aos 35 dias de idade que foram alimentados com dieta de baixa proteína após o desmame (SMITA et al, 1992).

Entretanto, quando os animais atingiram a idade adulta foi observado apenas efeito da dieta hiperlipídica aumentando a atividade da lipase pancreática. Tais respostas podem estar associadas ao nível de substrato disponível no trato gastrointestinal, mostrando que a atividade das enzimas digestivas são moduladas de acordo com os níveis de substrato, variando a produção e secreção destas enzimas (CHOWDHURY et al, 2000; SEFCIKOVA et al., 2008). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos com ratos adultos alimentados com dieta hiperlipídicas (WICKER e PUIGSERVER, 1988, CHOWDHURY

et al., 2000, ALMEIDA 2013) e em suínos (JAKOB ET AL., 2000, HEDEMANN et al., 2001).

Além disso, o grau de saturação da gordura pode estar envolvido com as respostas obtidas neste estudo. Sabe-se que a inclusão de gorduras poliinsaturadas na dieta, como as usadas neste estudo, aumenta a atividade específica da lipase quando comparada a inclusão de gorduras saturadas (SAAB et al., 1986; RICKETTS e BRANNON, 1994). No entanto, a presença de gordura poliinsaturada na dieta não pode explicar a atividade reduzida da lipase observada no grupo RCH. Assim, outros fatores desconhecidos podem estar contribuindo para a diminuição da atividade desta enzima.

Entretanto, a alta atividade da lipase observada nos animais adultos que receberam dieta hiperlipídica não foi suficiente para o desenvolvimento da obesidade. Isso está relacionado, provavelmente, com a menor quantidade de triglicerídeos e VLDL séricos observados nesses animais, de acordo com o apresentado no capítulo II, prejudicando o transporte dos lipídeos do fígado para os depósitos de tecido adiposo, ao mesmo tempo acarretando maior deposição de gordura no fígado e diminuição na quantidade de glicogênio hepático produzido. Essa alteração no transporte de gordura também foi observada por Samuel et al. (2004). Com isso, a gordura ingerida e absorvida pelo intestino delgado não alcançou os depósitos nos tecidos de reserva, não desenvolvendo a obesidade. Uma outra hipótese que não pode ser descartada é a perda de gordura nas fezes visto que a dieta tinha alto teor de gordura, mesmo os animais apresentando alta atividade da lipase.

Por outro lado, a curto prazo a restrição de nutrientes imposta às mães durante o período de gestação aumentou a atividade da quimiotripsina na prole, enquanto que a restrição durante a gestação e lactação não alterou a função enzimática desta enzima. Em animais adultos não foram observadas mudanças na atividade enzimática. Estas respostas sugerem que, o processo de síntese da quimiotripsina é preservado, mesmo frente à diminuição do aporte de nutrientes durante a gestação e/ou lactação.

A atividade da quimiotripsina também não foi afetada pela dieta. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com suínos nos quais foram utilizadas diferentes fontes de lipídeos (NUNES, 1986) e em estudos com ratos (WICKER e PUIGSERVER, 1988; PROST et al, 1988). No entanto, ainda são poucos os relatos que

relacionam dieta hiperlipídica e atividade de quimiotripsina, o que dificulta a comparação dos resultados.

Ao avaliar a atividade da tripsina observou-se que, às 16 semanas de idade, os animais filhos de mães submetidas à restrição alimentar durante a gestação apresentaram maior atividade da enzima, quando comparado a animais filhos de mães restritas na gestação e lactação, independente da dieta fornecida após o desmame.

A não redução da atividade da tripsina observada nesses animais pode indicar uma resposta adaptativa tardia do pâncreas aumentando a capacidade de secreção de enzimas num período de pouca oferta de alimentos. Estudos mostram que em situação de privação de nutrientes, a célula acinar redireciona seletivamente a síntese de proteínas para a produção de certas proteínas aniônicas, como o tripsinogênio (APTE et al, 1995). Além disso, a desnutrição quando imposta de maneira moderada ou de duração limitada, como aconteceu neste trabalho, preserva as proteases, e a atividade enzimática volta a níveis normais quando ocorre a reabilitação nutricional (SAUNIERE et al., 1986).

A atividade das dissacaridases intestinais não foi alterada ao desmame pela restrição alimentar, já na idade adulta foi observado que animais submetidos a restrição de nutrientes durante a gestação e/ou lactação, independente da dieta após desmame, apresentaram menor atividade destas enzimas. Desta forma, fica evidente que o fornecimento de uma dieta com maior oferta de nutrientes durante a lactação às ratas mães que sofreram restrição calórico-proteica durante a gestação, não foi suficiente para potencializar a atividade das dissacaridases intestinais. Do mesmo modo, a dieta com maior oferta de nutrientes após o desmame não foi suficiente para impedir manifestações tardias da restrição alimentar.

De fato, é sabido que a secreção de enzimas intestinais é afetada pelo tipo de dieta e por fatores hormonais e genéticos. A nutrição tem papel importante no período de transição do leite para o alimento sólido sobre a indução e repressão de genes responsáveis pela secreção de enzimas intestinais (EGOROVA et al., 2008). Neste sentido, fica evidente que o trato gastrointestinal tem considerável poder de adaptação, podendo variar suas funções através de alterações no número e especificidade de enzimas digestivas e transportadores de nutrientes (FERRARIS, 2001).

Foi observado também que a atividade das dissacaridases intestinais diminuiu nos animais que consumiram dieta hiperlipídica. Uma possível explicação para esse resultado

seria a composição da dieta ingerida pelos animais após o desmame. A dieta controle apresentou-se com teor de carboidrato maior do que a dieta hiperlipídica e, essa diferença no teor de carboidrato, afetou a quantidade de substrato no lúmen intestinal e consequentemente a secreção dessas enzimas.

Vários estudos têm mostrado que dietas com alto nível de lípidios alteraram a estrutura da membrana das células intestinais, promovendo alteração nas enzimas da bordadura em escova (BRASITUS et al., 1985; GALLUSER et al., 1993; KAUR et al., 1996; e RUIZ-GUTIÉRREZ et al., 1997). De fato, estudos realizados em ratos demonstraram que a adição de óleo de milho na dieta promove menor atividade da sacarase (TAKASE e GODA, 1990). Entretanto, outros estudos não observaram alterações na atividade da sacarase (LINDLEY et al, 1995; ALMEIDA et al, 2013) e maltase (ALMEIDA et al, 2013).

Em conclusão, os resultados mostram que mudanças na atividade das enzimas digestivas podem ser influenciadas pela restrição alimentar materna na gestação e/ou lactação e a dieta após o desmame tem um importante papel na atividade dessas enzimas, amplificando os efeitos das condições nutricionais anteriores.

### Referências:

- AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. **AIN-93G Growth purified diet**. 2010. Disponível em: <[www.testdiet.com](http://www.testdiet.com)>, acessado em 16 jun. 2011.
- AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. **AIN-93M maintenance purified diet**. 2011. Disponível em: <[www.testdiet.com](http://www.testdiet.com)>, acessado em 16 jun. 2011.
- ALMEIDA, F.N.; ANDRADE, M.L.; MORAES, M.F.; CHIMIN, P.; ALMEIDA, K.N.; PERALTA, R.M.; NATALI, M.R.M. (2013). Obese adult phenotype: Adaptations of small intestine to cafeteria diet and aerobic physical training after weaning. **Sci sports**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scispo.2013.04.004>>, acessado em 07 jun. 2013.
- APTE, M. V.; WILSON, J. S.; KORSTEN, M. A.; MCCAUGHAN, G. W.; HABER, P.S.; PIROLA, R. C. (1995). Effects of ethanol and protein deficiency on pancreatic digestive and lysosomal enzymes. **Gut**, v. 36, p.287-293.

- BARKER, D. J. (1998). In utero programming of chronic disease. **Clin Sci**, v. 95, n. 2. p. 115-28.
- BARKER, D.J.P. (2007). The origins of the developmental origins theory. **J. Intern. Med.**, v.261, p.412-7.
- BRANNON, P.M. (1990). Adaptation of the exocrine pancreas to diet. **Annual Review Nutrition**, v.10, p.85-105.
- BRASITUS, T.A.; DAVIDSON, N.O.; SCHACHTER, D. (1985) Variations in dietary triacylglycerol saturation alter the lipid composition and fluidity of rat intestinal plasma membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, 812:460-472.
- CHOWDHURY, P.; NISHIKAWA, M.; BLEVINS, G.W.; RAYFORD, P.L. (2000). Response of rat exocrine pancreas to high-fat and high-carbohydrate diets. **Exp. Bio. Med.**, v.223, p.310-315.
- CORRING, T. (1980). The adaptation of digestive enzymes to the diet: its physiological significance. **Reprod. Nurr. Devel.** 20, 1217-1235.
- DAHLQUIST, A. (1964). Method for assay of intestinal disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, v.7, p.447-454.
- DESAI, M., GAYLE, D.; BABU, J. ROSS, M.G. (2007) The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 196, p.555e1-555e7.
- DRAKE, A.J.; WALKER, B.R. (2004). The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. **J. Endocrinol**, v.180, p.1–16.
- ERLANGER, B.F.; EDEL, F.; COOPER, A.G. (1966). The action of chymotrypsin on two new chomogenic substrates. **Archive. Biochemistry. Biophysical**, v.115, p.206-210.
- EGOROVA, V.V.; NIKITINA, A.A.; TIMOFEEVA, N.M. (2008). Effect of weaning terms and protein deficit in rat pup nutrition on activities of digestive enzymes. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, V. 44, N. 5, p. 591-598.
- FERRARIS, R.P. (2001). Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. **Biochemistry Journal**, v.360, p.265-276.

- GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. (2001). Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr*, v. 4, n. 2, p. 611-24.
- GRAHAM, C. F. (1941). A device for the diagnosis of *Enterobius vermicularis*. **Am. J. Trop. Med.**, 21: 159 – 161.
- GURMINI, J.; CECÍLIO, W.A.C.; SCHULER, S.L.; OLANDOSKI, M.; NORONHA, L. (2005). Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após lactação. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 41, n. 4, p. 271-8.
- HARADA, E. (1990). Lowering of pancreatic amylase activity induced by cold exposure, fasting and adrenalectomy in rats. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 98A, n.2, p. 333-338.
- HEDEMAN, M.S.; PEDERSEN, A.R.; ENGBERG, R.M. (2001). Exocrine pancreatic secretion is stimulated in piglets fed fish oil compared with those fed coconut oil or lard. **J Nutr**, 131:3222-6.
- HODHOD, M.A.El.; NASSAR, M.F.; HETTA, O.A.; GOMAA, S.M. (2005). Pancreatic size in protein energy malnutrition: a predictor of nutritional recovery. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.59, p.467-473.
- JAKOB, S.; MOSENTHIN, R.; ZABIELSKI, R.; RIPPE, C.; WINZELL, M.S.; GACSALYI, U.; LAUBITZ, D.; GRZESIUK, E.; PIERZYNOWSKI, S.G. (2000). Fats infused intraduodenally affect the postprandial secretion of the exocrine pancreas and the plasma concentration of cholecystokinin but not of peptide YY in growing pigs. **J Nutr**, 130:2450-5.
- KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v.51, p.376-382.
- KAUR, M.; KAUR, J.; OJHA, S. (1996). Mahmood A. Dietary Fat Effects on Brush Border Membrane Composition and Enzyme Activities in Rat Intestine. **Ann Nutr Metab**, 40:269–276.
- KHEROUA, O.; BELLEVILLE, J. (1981). Behaviour of digestive enzymes in the pancreatic juice and pancreas of rats fed on a low-protein diet (3 p. 100 of cereal protein) then on a balanced diet (23.5 p. 100 of mixed protein). **Reproduction Nutrition Development**, v.21, p.901-917.

- LEANDRO, C.G.; AMORIM, M.F.; HIRABARA, S.M.; CURI, R.; CASTRO, R.M. (2009). Pode a atividade física materna modular a programação fetal induzida pela nutrição? **Rev. Nutr.**, v.22, p.559-569.
- LEBENTHAL, E.; NITZAN, M.; CHRZANOWSKI, B.L.; KRANTZ, B. (1980). The effect of reduced maternofetal blood flow on the development of fetal pancreatic acinar cells and enzymes. **Pediatric Research**, v.14, p.1356-1359.
- LINDLEY, K.; MULLER, D.P.R.; MILLA, P.J. (1995) Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on small intestinal secretory and absorptive function: studies in rat jejunum in vitro. **Clin. Sci.** (Lond.) 88: 219–224.
- LÓPEZ, J.M.; BOMBI, J.A.; VALDERRAMA, R.; GIMÉNEZ, A.; PARÉS, A.; CABALLERIA, J.; IMPERIAL, S.; NAVARRO, S. (1996). Effects of prolonged ethanol intake and malnutrition on rat pancreas. **Gut**, v.38, p. 285-292.
- McARDLE, H.J., ANDERSEN, H.S.; AMBLING, L. (2006). Fetal programming: causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats – a review. **Placenta**, v.27, p.56-60.
- McMILLEN, C.; ROBINSON, J.S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity and programming. **Physiology Reviews**, v.85, p.571-633.
- NAGY, I.; PAP, A.; VARRO, V. (1989). Time-course of changes in pancreatic size and enzyme composition in rats during starvation. **International Journal of Pancreatology**, v.62, p.600-605.
- NAKAJIMA, K.; NEMOTO, T.; MUNEYUKI, T.; KAKEI, M.; FUCHIGAMI, H.; MUNAKATA, H. (2011). Low serum amylase in association with metabolic syndrome and diabetes: A community-based study. **Cardiovascular Diabetology**, v. 10, p. 34-41.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (1995). **Nutrient requirements of laboratory animals**. Washington D.C.: Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, National Academic Press, 4ª edição, 175p. Disponível em:  
<<http://www.nap.edu/catalog/4758.html>>, acessado em 16 mar. 2011.

- NICHOLL, R.M.; DEENMAMODE, J.M.; GAMSU, H.R. (2008). Intrauterine growth restriction, visceral blood flow velocity and exocrine pancreatic function. **BioMedCentral Research Notes**, v.1, p.115-120.
- NISSEN, P.M.; NEBEL, C.; OKSBJERG, N.; BERTRAM, H.C.. (2011) Metabolomics reveals relationship between plasma inositols and birth weight: possible markers for fetal programming of type 2 diabetes. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, vol/is.2011/1110-7243, p.1110-7251.
- NUNES, C.S. (1986). Adaptation of pancreatic lipase to the amount and nature of dietary lipids in the growing pig. **Reprod. Nutr. Dev.**, 26(6):1273-80.
- PROST, J.; BELLEVILLE, J.; VALANTIN-ROLLET, C. (1988). Effects of age, and protein malnutrition followed by a balanced diet on the non-parallel change in digestive enzymes in the pancreas and their secretion in the rat. **British Journal of Nutrition**, 60, 619-631.
- RICKETTS, J.; BRANNON, P.M. (1994). Amount and type of dietary fat regulate pancreatic lipase gene expression in rats. **J Nutr**, 124: 1166–1171
- RUIZ-GUTIÉRREZ, V.; SANTA-MARIA, C.; PLANAS, J.M.; VÁZQUEZ, C.M. (1997) Membrane lipid composition and fluidity influence on membrane protein function. **Recent Dev. Lipids Res.**, 1:305-321.
- SABB, J.E.; GODFREY, P.M.; BRANNON, P.M. (1986). Adaptative response of rat pancreatic lipase to dietary fat. Effects of amount and type of fat. **Journal of Nutrition**, 116:892-899.
- SAMUEL, V.T.; LIU, Z.X.; QU, X.; ELDER, B.D.; BILZ, S.; BEFROY, D.; ROMANELLI, A.J.; SHULMAN, G.I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, 32345-32353.
- SARLES, H.; LAHAIE, R.; DOLLET, J.M.; BECK, B.; MICHEL, R.; DEBRY, G. (1987). Effect of parental malnutrition on enzyme content of rat pancreas. **Digestive Diseases and Sciences**, V. 32, N. 5, p. 520-528
- SAUNIERE, J. F.; SARLES, H.; ATTIA, Y.; LOMBARDO, A.; YOMAN, T. N.; LAUGIER, R.; MANLAN, K.; SAHEL, J. (1986). Exocrine pancreatic function of

- children from the Ivory Coast compared to French children: effect of kwashiorkor. **Digestive Disease Science**, v.31, p.481-486.
- SEFCIKOVA, Z.; HÁJEK, T.; LENHARDT, L.; RACEK, L.; MOZES, S. (2008). Different functional responsibility of the small intestine to high-fat/high-energy diet determined the expression of obesity-prone and obesity-resistant phenotypes in rats. **PhysiolRes**, 57:467-74.
- SMITA, K.; RAINA, M.; TASKAR, S.P. (1992). Effect of induced protein malnutrition and subsequent rehabilitation on the biochemical profile of pancreas of rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 7(2):147-154.
- TAKASE, S.; GODA, T. (1990) Effects of medium-chain triglycerides on brush-border membrane-bound enzyme activity in rat small intestine. **J. Nutr.**, 120: 969–976.
- TIMOFEEVA, N.M.; EGOROVA, V.V.; IEZUITOVA, N.N.; NIKITINA, A.A. (2001). Activity of digestive enzymes in small intestine in rat pups whose mothers were kept on low protein diet during pregnancy and lactation. **J. Evol. Biochem. and Physiol.**, v.37, p.101-106.
- TIMOFEEVA, N.M.; EGOROVA, V.V.; NIKITINA, A.A. (2008). Quality of nutrition during pregnancy or lactation programs functioning of enzyme systems of digestive and non digestive organs in “grandchildren” during their adult life. **J. Evol. Biochem. and Physiol.**, v.44, p.254-257.
- VICKERS, M.H.; BREIER, B.H.; CUTFIELD, W.S.; HOFMAN, P.L.; GLUCKMAN, P.D. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **American Journal of Endocrinology Metabolic**, v.279, p.E83-E87.
- VICKERS, M.H.; REDDY, S.; IKENASIO, B.A.; BREIER, B.H. (2001). Dysregulation of the adipoinular axis-a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. **Journal of endocrinology**, v. 170, p. 323-332.
- VICKERS, M.H.; BREIER, B.H.; MCCARTHY, D.; GLUCKMAN, P.D. (2003). Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.285, n.154-1, p. R271-R273.

- WEBSTER, P.D.; SINGH, M.; TUCKER, P.C.; BLACK, O. (1972). Effects of fasting and feeding on the pancreas. **Gastroenterology**, 62, 600-605.
- WICKER, C.; SCHEELE, G.A.; PUIGSERVER, A. (1988). Pancreatic adaptation to dietary lipids is mediated by changes in lipase mRNA. **Biochimie**, v. 70, p.1277-83.
- WILLIS, H. HASTINGS. (1921). A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Med. J. Aust.**, v. 11, p. 375-376.
- YEGNESWARAN, B.; PITCHUMONI, C.S. (2010). When should serum amylase and lipase levels be repeated in a patient with acute pancreatitis? **Cleveland Clinic Journal Medicine**, v. 77, p.230-231.

## **Capítulo IV**

### **Implicações**

A nutrição materna durante os períodos de gestação e lactação é fator relevante para a saúde e qualidade de vida dos animais na idade adulta. O tipo de alimentação ingerida pela mãe, nestes períodos, poderá interferir no desenvolvimento do feto de forma permanente, com alterações no seu metabolismo e na morfofisiologia dos seus órgãos. A dieta após desmame também pode acarretar prejuízos ao animal quando em desequilíbrio de nutrientes ou com altos teores de energia. Assim, os resultados obtidos neste experimento permitem reforçar a necessidade de uma alimentação materna equilibrada durante os períodos mais críticos do desenvolvimento de um indivíduo.

O tempo experimental poderia ser ampliado, pois pode ser que essa alimentação de alto teor de lipídeos provocasse alterações em longo prazo no organismo do animal. Além disso, a fonte de lipídeos pode ser um fator considerado na formulação da dieta desses animais.

A nutrição materna durante a gestação também tem implicações no peso ao nascer da prole de animais de gestação múltipla, pois a distribuição de nutrientes é diferente para os fetos ao longo do útero. Assim, a restrição nutricional das mães pode aumentar essa diferença de peso entre os filhotes ao nascer, o que acarreta também diferenças metabólicas entre indivíduos de uma mesma ninhada, culminando em maior prejuízo no desenvolvimento de animais nascidos muito leves ou muito pesados.

A avaliação da condição metabólica das mães também é um fator interessante a ser estudado, já que possivelmente durante a restrição de nutrientes haja modificações metabólicas na mãe que influenciam o desenvolvimento da sua prole.

Poderiam ser consideradas outras análises para futuras pesquisas na área como a dosagem de hormônios ligados ao metabolismo lipídico e de glicose, como a insulina, a leptina e a grelina, que também podem ser alterados com a programação fetal, assim como o seu mecanismo de sinalização hipotalâmica.

Além disso, é interessante também avaliar as excretas dos animais para determinar a quantidade de nutrientes dos alimentos perdidos nas fezes.