



INVESTIGAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DO LEITE MATERNO DE CAMUNDONGOS OBESOS E SUA CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS METABÓLICOS DA PROLE

Palavras-Chave: PROGRAMAÇÃO METABÓLICA, LEITE MATERNO, PROLE

Autores/as:
MAIARA DE JESUS DA SILVA, (FCA)
MAYARA BAQUEIRO DA NÓBREGA, (FCA)
Profª. Drª . ADRIANA SOUZA TORSONI, (FCA)

INTRODUÇÃO:

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade pode ser definida como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, que pode em algum momento prejudicar a saúde do indivíduo. Considerada uma doença crônica, a obesidade possui causas multifatoriais que podem afetar todos os ciclos da vida e nos últimos anos demonstrou um aumento epidêmico preocupante em suas taxas mundiais, que se tornou um problema de saúde pública em vários países. Atrelado ao crescimento das taxas populacionais globais, o número de mulheres com sobrepeso ou obesidade durante a gestação e lactação também aumentou acentuadamente nas últimas décadas, sendo este dado preocupante, visto que estudos recentes sugerem que o quadro de sobrepeso e obesidade materno podem estar associados com aumento do risco de complicações gestacionais/neonatais e na composição do leite humano (LH), que pode impactar a programação inicial do desenvolvimento do lactente (HORTA, et al., 2019; LEGHI et al., 2020; CHEN et al. 2017). O leite materno é um fluido biológico produzido pelas glândulas mamárias de mamíferos para conferir nutrição a seus filhos e possibilitar o desenvolvimento de seus sistemas fisiológicos (ANDREAS et al., 2015). No início da vida, o leite é a única fonte de nutrição para o recém-nascido lactente, portanto a composição deste alimento demonstra ser um fator crucial para o desenvolvimento de alterações metabólicas e os desfechos vitais do recém-nascido (CHEN et al. 2017).

Na literatura científica, estudos já demonstram que durante a gestação e lactação de camundongos, uma dieta rica em gordura (HFD) e a obesidade encontram-se associadas com alterações no metabolismo lipídico, aumento dos níveis de colesterol,

desenvolvimento de fígado gorduroso, estresse do retículo endoplasmático, desregulação da homeostase energética e da ingestão alimentar, dentre outras modificações na prole (FANTE et al., 2016; DESAI, HAN, ROSS, 2016. LEMES et al., 2018;). Um estudo realizado por Kruse e colaboradores em 2013, evidenciou que a prole de mães obesas alimentadas com uma HFD na idade adulta apresentou um aumento do peso corporal, aumento dos níveis de glicose e insulina no sangue e de triglicerídeos hepáticos em comparação a prole controle (KRUSE et al, 2013).

O estudo de Ellsworth e seus colaboradores (2020), mostrou que a composição do leite humano de mães obesas duas semanas pós-parto apresentou maiores níveis de insulina e alteração no perfil de ácidos graxos, quando comparado às mães eutróficas, havendo redução de ácidos graxos com ação protetora, como o ácido oleico e o ácido linoleico, e maiores níveis de ácidos graxos promotores de inflamação e obesidade, incluindo o ácido palmítico. (ELLSWORTH, et al., 2020). Ademais, outro estudo realizado por Prentice e colaboradores (2016), evidenciaram que mudanças na composição do leite humano têm o potencial de promover ganho de peso e deposição de gordura no lactente, quadro esse que pode aumentar o risco do desenvolvimento de obesidade e outras doenças metabólicas, como hipertensão e diabetes (PRENTICE et al, 2016).

Desta forma, verifica-se que as alterações na composição do leite ocasionadas pelo estado nutricional e dieta materna podem impactar na programação inicial do crescimento e desenvolvimento infantil, estando associadas ao sobrepeso e obesidade durante a infância e a vida adulta (GEORGE et al, 2019; ELLSWORTH et al., 2020).

Assim, tendo em vista que a composição do leite materno, influenciado pela dieta e estado nutricional da lactante, pode

afetar a programação metabólica dos recém-nascidos e assim também pode influenciar no desenvolvimento de distúrbios metabólicos futuros, o objetivo geral do presente projeto foi correlacionar o perfil lipídico do leite materno de camundongas da linhagem C57/BL6, submetidas à dieta hiperlipídica (HF) e controle (CT), com parâmetros metabólicos da prole.

METODOLOGIA:

1. Animais Experimentais

Todos os procedimentos foram executados conforme as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e de acordo com a legislação vigente que estabelece procedimentos para uso científico de animais (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008). Práticas de biossegurança animal foram aplicadas e houve o monitoramento frequente de saúde de todos os animais experimentais. A aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) foi obtida através do Protocolo nº 5639-1/2020.

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem C57/BL6 com 5 semanas de idade provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram alojados individualmente ou em grupos de até 4 animais por caixa, dispostas em estantes ventiladas sob ambiente com termoneutralidade constante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclos de 12 horas claro (06:00am. às 18:00pm.) e 12 horas escuro (18:00pm às 6:00am.), com livre acesso à alimentação e água.

Com 5 semanas de vida, as fêmeas foram divididas aleatoriamente em dois grupos: fêmeas alimentadas com dieta controle (CT, Research Diet D12450B) e fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica (HF, Research Diet D12451) para indução da obesidade materna (Tabela 1). Os machos foram alimentados com dieta controle. Após 8 semanas de adaptação com as respectivas dietas ocorrerá o acasalamento. A mesma dieta da adaptação será mantida durante a gestação e lactação.

Para avaliar a influência do ambiente materno durante gestação e lactação, após o nascimento da prole foi realizado o pareamento dos filhotes machos e fêmeas, sendo estabelecido 6 filhotes por ninhada (3 fêmeas e 3 machos); estes permaneceram mamando em suas respectivas mães e após o desmame os animais foram eutanasiados para futuras

análises.

Tabela 1. Composição da dieta controle (Research Diet D12450B) e hiperlipídica (Research Diet D12451).

	CONTROLE	HIPERLIPÍDICA
Carboidratos (%)	70	35
Proteínas (%)	20	20
Gorduras (%)	10	45
Densidade energética (kcal/g)	3,82	4,7

Fonte Proteica: caseína e L-cistina. **Carboidratos:** sacarose (CT=35% sacarose, HF= 17% sacarose), amido de milho e maltodextrina. **Lípidios:** óleo de soja e banha de porco.

2. Coleta de Leite

O leite foi coletado das fêmeas no 12º e 16º dia de lactação. Para a realização do procedimento, as mães e seus filhotes foram separados por 2 a 4 horas. Após este período, foi administrado ocitocina (4UI/kg, ip) e, em seguida, as fêmeas foram anestesiadas com anestésico inalatório isoflurano. A área dos mamilos foi umedecida com água esterilizada e o leite foi coletado por meio da ordenha manual.

3. Análise do Leite

As amostras de leite coletadas foram congeladas a -80°C para análise de triglicerídeos, colesterol e glicose.

4. Parâmetros Metabólicos da prole

O peso corporal da prole foi aferido durante o período de lactação (dias 4,8,12, 16 e 20) e após o desmame (dia 21). Logo após o desmame foi realizado o teste de tolerância à glicose (GTT) e o teste de tolerância à insulina (ITT). Para estes testes, os animais foram submetidos ao jejum noturno de 12 horas, seguido por um período de 2 horas de realimentação, e novamente um jejum de 4 horas. Para o início dos testes, foi administrada glicose (1g/kg,ip) para o GTT e insulina (1,5UI/kg, ip) para o ITT.

5. Sacrifício e extração

Para a preparação da eutanásia, todos os animais ficaram em jejum noturno de 12 horas. As mães e os filhotes foram eutanasiados por meio da administração de anestesia (Quetamina de Sódio, Xilazina). Foram coletados os tecidos adiposos epididimal (machos), epigonadal (fêmeas) e retroperitoneal.

6. Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism 9.0 (La Jolla, CA). Os dados foram verificados quanto à aderência à normalidade por meio do teste Shapiro-Wilk, e quanto à igualdade das variâncias pelo teste de Levene. Para os dados com distribuição normal e homoscedasticidade, foi realizado o

teste T de Student não pareado ou teste Two-Way Anova seguido do pós-teste Bonferroni. Para os dados não-normais e/ou sem igualdade de variâncias, foi realizado o teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Para avaliação da correlação entre as variáveis foi aplicado a Correlação de Pearson. Os resultados foram apresentados em Média \pm Erro Padrão da Média, com nível de significância estabelecido em 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Após o período de lactação, foi observado que as mães do grupo HF apresentaram um peso corporal (g) maior quando comparado ao grupo CT (**Figura 1A**). Também foi observada uma tendência a uma maior quantidade de massa gorda (g) e massa magra (g) nas mães HF quando comparada às mães CT (**Figura 1 B-D**).

Com relação à ingestão de leite da prole durante o período da primeira e segunda semana de lactação, foi observado que a prole fêmea de mães HF apresentaram maior ingestão na primeira semana, bem como uma tendência ao maior consumo de leite acumulado ao longo da lactação, quando comparado a prole fêmea de mães CT (**Figura 2d**). Não foi observado diferença estatística nos machos (**Figura 2A-B**). Em relação a evolução do peso corporal da prole durante o período de lactação, foi observado um aumento no peso a partir do 12º dia de lactação em machos e fêmeas de mães HF, quando comparados à prole CT (**Figura 3A-B**).

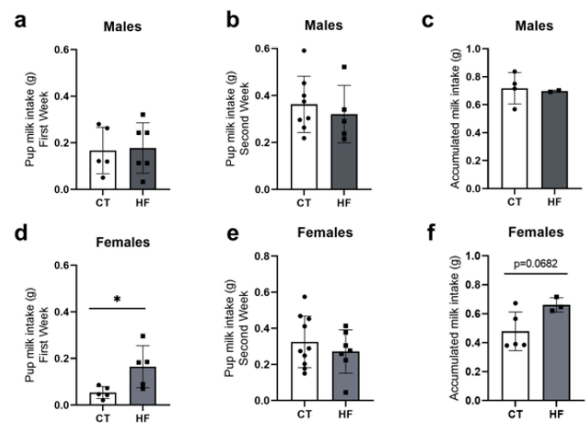


Figura 2. Ingestão de leite da prole durante o período de lactação. (a,b,c) Ingestão de leite na primeira e segunda semana de vida de filhotes machos do grupo CT e HF. (d,e,f) Ingestão de filhotes fêmeas pertencentes ao grupo CT e HF, n=2-6/grupo. Foi aplicado o teste T de student não pareado para a comparação entre grupos. (*) $p < 0.05$.

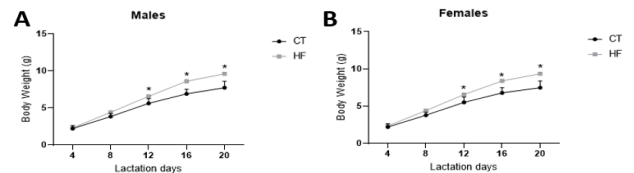


Figura 3. Evolução do peso corporal da prole durante o período de lactação. N=10/grupo. ANOVA twoway foi utilizado para a comparação entre os grupos. (*) $p < 0.05$.

Parâmetros metabólicos da prole estão apresentados nas **Figura 4 a 10**. Por meio da avaliação da composição corporal da prole após o desmame, foi observado um aumento de massa magra (g) e de massa gorda (g) em machos HF (**Figura 4A**). No caso da prole fêmea, foi identificado maior peso corporal e aumento na massa magra (g) no grupo HF (**Figura 4B**).

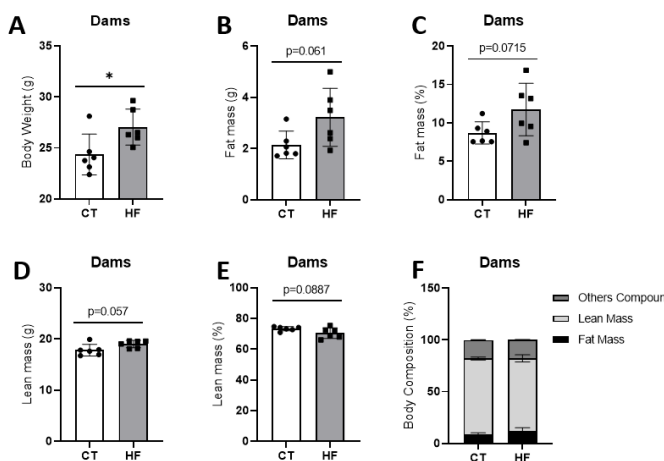
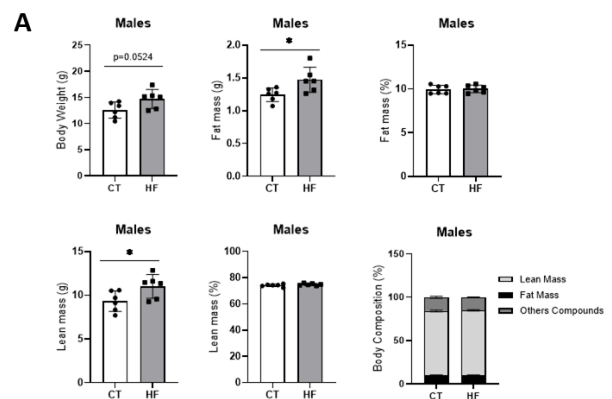


FIGURA 1. Análise da composição corporal de fêmeas (CT e HF) após o período de lactação em gramas (g) e porcentagem (%) relativa a composição corporal total. (A) Peso bruto corporal (g). (B,C) Quantidade de massa gorda (g e %). (D,E) Quantidade de massa magra (g e %). (F) Composição Corporal Total (%). N=6/grupo. (*) $p < 0.05$.



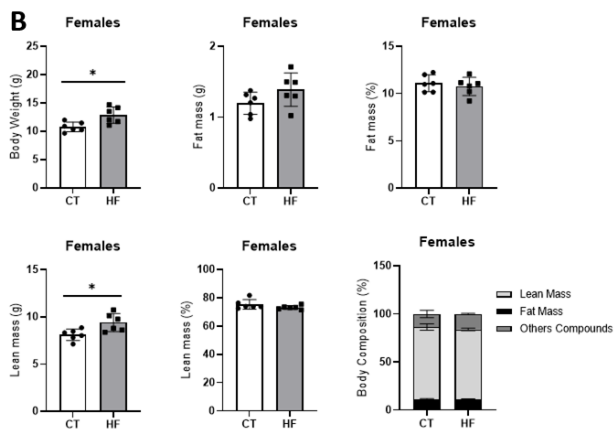


Figura 4. Análise da composição corporal de filhotes machos e fêmeas (CT e HF) em gramas (g) e porcentagem (%) relativa a composição corporal total. N=6/grupo. (*) p<0.05.

Por meio dos resultados obtidos a partir da calorimetria indireta na prole pós-lactação, foi observado que a prole macho de mães HF apresentou uma redução em sua taxa respiratória no ciclo escuro e em sua produção de calor durante o ciclo claro, quando comparado a prole macho de mães CT (**Figura 5C e 5E**). Não foi observada nenhuma outra diferença significativa em outras variáveis. Quando observados os mesmos parâmetros na prole fêmea, foi identificado que a prole fêmea de mães HF apresentaram uma diminuição da taxa respiratória no ciclo escuro quando comparado à prole descendente de mães CT (**Figura 6C**).

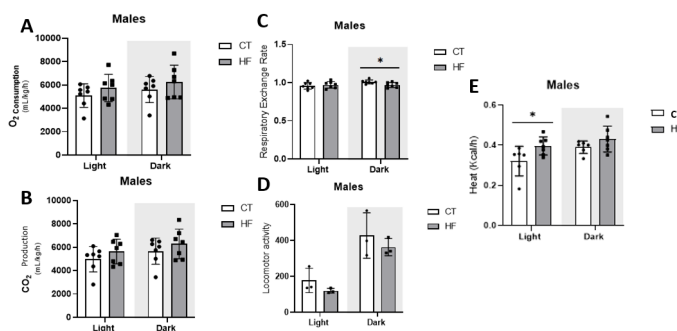


Figura 5. Análise por Calorimetria Indireta em filhotes machos CT e HF no período claro e escuro. (A) Consumo de O₂, (B) Produção de CO₂, (C) Taxa respiratória, (D) Atividade Locomotora, (E) Produção de Calor. N=3-7/grupo. (*) p<0.05

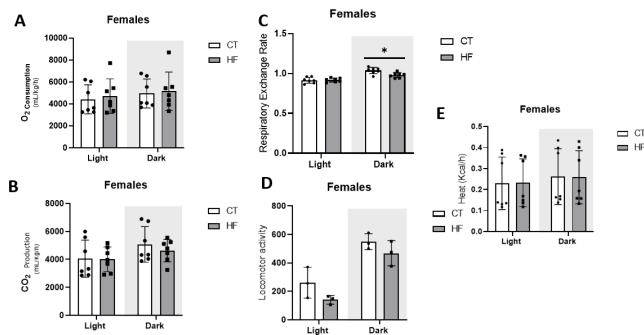


Figura 6. Análise por Calorimetria Indireta em filhotes fêmeas CT e HF no período claro e escuro. (A) Consumo de O₂, (B) Consumo de CO₂, (C) Taxa respiratória, (D) Atividade Locomotora, (E) Produção de Calor. N=3-7/grupo. (*) p<0.05

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos CT e HF, tanto na prole fêmea, quanto na prole macho nos testes de Tolerância à Glicose (GTT) e Tolerância à Insulina (ITT) (**Figuras 7 e 8**).

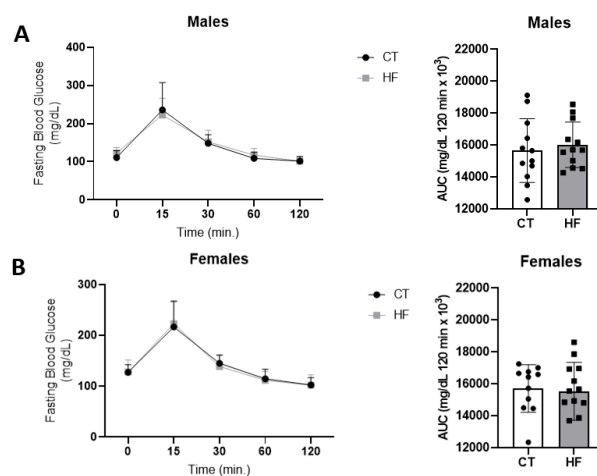


Figura 7. Teste de tolerância à glicose após o desmame. (A) Teste de tolerância à glicose em filhotes machos. (B) Teste de tolerância à glicose em filhotes fêmeas. n= 11-13/grupo. ANOVA two-way para a comparação entre grupos ao longo do tempo e teste T de student não pareado para a comparação entre grupos. (*) p<0.05

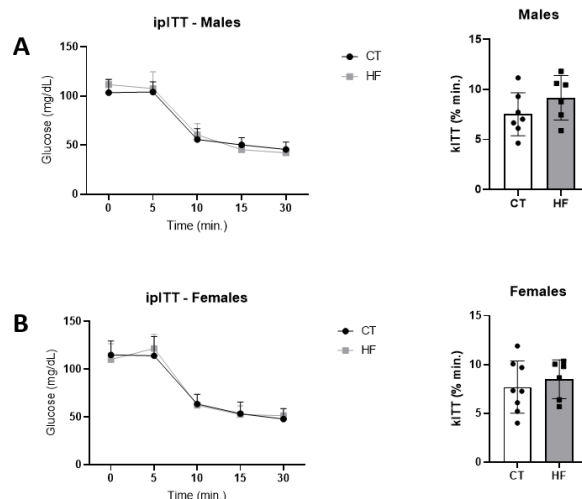


Figura 8. Teste de tolerância à insulina após o desmame no 21º dia de vida da prole. (A) Teste de tolerância à insulina filhotes machos. (B) Teste de tolerância à insulina em filhotes fêmeas. n= 7-8/ grupo. ANOVA two-way para a comparação entre grupos ao longo do tempo e teste T de student não pareado para a comparação entre grupos. (*) p<0.05

Ao 28º dia de vida da prole, foi realizada aferição da glicemia em jejum e a eutanásia seguida pela coleta dos tecidos adiposos epigonadal e retroperitoneal, para cálculo da adiposidade da prole. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos CT e HF (**Figura 9**).

Quando à análise da composição do leite materno de camundongos fêmeas, não foram observadas diferenças estatísticas entre os níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol total nos grupos CT e HF (**Figura 10**).

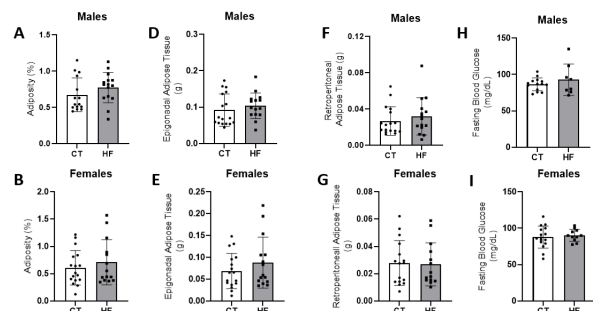


FIGURA 9. (A e B) Dados da prole CT e HF com 28 dias de vida. Adiposidade em filhotes machos e fêmeas. (D e E) Tecido adiposo epigonadal (g) de machos e fêmeas. (F e G) Tecido adiposo retroperitoneal (g) de machos e fêmeas. (H e I) Glicemia em jejum de machos e fêmeas (mg/dL). n=12/grupo (*) p<0.05

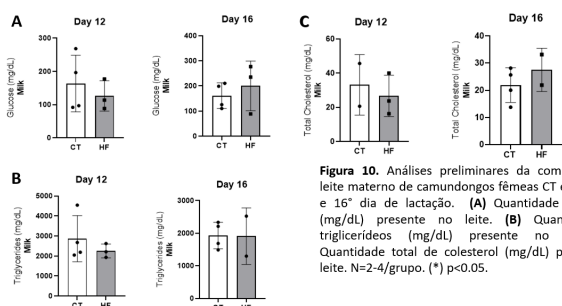


Figura 10. Análises preliminares da composição do leite materno de camundongos fêmeas CT e HF no 12º e 16º dia de lactação. (A) Quantidade de glicose (mg/dL) presente no leite. (B) Quantidade de triglicerídeos (mg/dL) presente no leite. (C) Quantidade total de colesterol (mg/dL) presente no leite. N=2-4/grupo. (*) p<0.05.

CONCLUSÕES:

No presente estudo, verificamos os efeitos de uma dieta materna rica em gordura durante a gestação e lactação sobre os parâmetros metabólicos da prole pós-lactação. Através do desenho experimental, foi observado que a exposição materna a uma dieta rica em gordura durante esse período de desenvolvimento foi capaz de contribuir para um maior ganho de peso corporal e uma tendência a maior adiposidade em seus descendentes.

Considerando que a única nutrição recebida pelos filhotes até o 21º dia de vida foi o leite materno, observou-se uma possível interferência da dieta materna no desenvolvimento dos descendentes, já que foi constatado maior peso a partir do 12º dia de lactação da prole de mães alimentadas com dieta HF, quando comparado a prole de mães CT. Adicionalmente, a dieta materna HF

durante a gestação e lactação também impactou no aumento da ingestão de leite em fêmeas de mães HF, mas não em machos.

Quando à análise de parâmetros metabólicos da prole, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos. Acredita-se que essa ausência estatística seja ocasionada pela composição da dieta materna, visto que a fonte dos nutrientes é semelhante na dieta CT e HF, e a dieta controle apresenta o dobro na quantidade de sacarose, um açúcar simples que pode apresentar efeitos no metabolismo glicídico, bem como em outros parâmetros metabólicos (SHARMA, 2008).

Mesmo com um número baixo de amostras para a análise da composição do leite e sem diferenças estatísticas entre os resultados, é possível sugerir que o leite materno de mães HF apresente modificações em sua composição do 12º ao 16º dia de lactação. Devido a dificuldades encontradas durante a coleta do leite materno de camundongos, destacando-se o baixo número de camundongas aptas para a realização da coleta e baixa quantidade de leite obtida, não foi possível realizar o experimento de avaliação do perfil de ácidos graxos no leite materno previsto para esse projeto. Por isso, enfatiza-se a necessidade de um projeto futuro, seguindo as mesmas metodologias para a obtenção de maiores quantidades de leites.

Deste modo, concluímos que a dieta materna HF foi capaz de induzir um aumento na ingestão láctea, quando comparada à dieta materna CT, o que contribuiu para maior ganho de peso da prole. No entanto, a exposição materna a ambas as dietas não culminou em alterações bioquímicas e moleculares expressivas nas proles, muito provavelmente devido ao fato da dieta CT também apresentar efeito obesogênico como a dieta HF, o que precisa ser melhor investigado.

BIBLIOGRAFIA

- ANDREAS, N.J.; KAMPMANN, B.; LE-DOARE, K.M. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum.*, v.97, p. 629–635. *Dev.* 2015
- CHEN, Y., et al. Effect of high-fat diet on secreted milk transcriptome in midlactation mice. *Physiol Genomics*, v. 49, p. 747–762. 2017.
- DESAI, M.; HAN, G.; ROSS, M.G. Programmed hyperphagia in offspring of obese dams: Altered expression of hypothalamic nutrient sensors, neurogenic factors and epigenetic modulators. *Appetite*, v.99, p.193-9. 2016.
- ELLSWORTH, L., et al. Impact of maternal overweight and obesity on milk composition and infant growth. *Maternal & child nutrition*, v. 16, n. 3. 2020.
- LEMES, S. F. Maternal Consumption of High-fat Diet in Mice Alters Hypothalamic Notch Pathway, NPY Cell Population and Food Intake in Offspring. *Neuroscience*, v.371, p.1–15. 2018.
- FANTE, T; et al. Diet-Induced Maternal Obesity Alters Insulin Signaling in Male Mice Offspring Rechallenge with a High-Fat Diet in Adulthood. *PLoS one*, v. 11, n. 8. Aug. 2016.
- GEORGE, G; et al. Exposure to maternal obesity during suckling outweighs *in utero* exposure in programming for postweaning adiposity and insulin resistance in rats. *Scientific Reports*, v.9, July 2019
- HORTA, B.L., et al. Maternal anthropometry: trends and inequalities in four population-based birth cohorts in Pelotas, Brazil, 1982–2015. *International Journal of Epidemiology*, p.26–36. 2019.
- KRUSE, M, et al. High-fat intake during pregnancy and lactation exacerbates high-fat diet-induced complications in male offspring in mice. *Endocrinology*, v. 154, p. 3565–3576. Oct. 2013.
- LEGHI, G.E., et al. The impact of maternal obesity on human milk macronutrient composition: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, v. 12, n. 4, p. 934. 2020.
- NERI, Caterina; EDLOW, Andrea G. Effects of maternal obesity on fetal programming: molecular approaches. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 6, n. 2. 2016.
- ORGANIZATION, World Health. *Obesity and overweight*. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>
- PRENTICE P., et al. Breast milk nutrient content and infancy growth. *Acta Paediatr*, v.106, n.6, p. 641-647. Jun. 2016.
- PRIEGO, T., et al. Maternal dietary fat affects milk fatty acid profile and impacts on weight gain and thermogenic capacity of suckling rats. *Lipids*, v. 48, n. 5, p. 481-495. 2013.
- RIO-AIGE, K., et al. The Breast Milk Immunoglobulinome. *Nutrients* 2021, v.13, n. 6, May. 2021.