



Efeitos da subnutrição proteica pós-desmame na morfofunção do intestino delgado e gordura mesentérica em camundongos machos C57Bl6

Palavras-Chave: subnutrição proteica -1, trato gastrointestinal-2, gordura mesentérica-3

Autores(as):

Bruna Pires de Oliveira, FENF – UNICAMP

Dr^a Kenia Moreno de Oliveira (co-orientadora), IB – UNICAMP

Prof. Dr. Everardo Carneiro (orientador), IB – UNICAMP

Leticia Figueiredo, IB – UNICAMP

Dr^a Bruna Lourençoni, FCM - UNICAMP

Joel Silva, IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A desnutrição, seja por excesso ou deficiência nutricional, permanece um grave problema de saúde global. Dados da OMS revelam que em 2024 cerca de 50 milhões de crianças apresentavam baixo peso enquanto 150 milhões apresentavam baixa estatura para a idade. Nesse mesmo ano a desnutrição foi associada com 45% das causas de morte em crianças menores de 5 anos. A pandemia de COVID-19 agravou esse cenário, estima-se que entre 690 e 783 milhões de pessoas no mundo passaram fome em 2022, há projeção de que a subnutrição tenha aumento em até 14,3% após a pandemia (Fore et al., 2020; WHO, 2024).

A proteína é um nutriente essencial, sua eficácia no metabolismo é relacionada tanto a quantidade quanto a qualidade. Fontes proteicas completas como alimentos de origem animal, são menos acessíveis a populações de baixa renda, exacerbando a subnutrição (Thompson et al., 2021). Estudos em humanos e roedores demonstram que a restrição proteica durante o desenvolvimento está relacionada a adaptações metabólicas prejudiciais, especialmente no trato gastrointestinal (TGI), afetando digestão, absorção e função imunológica (Marroquí et al., 2012; Soriano et al., 2010). O intestino delgado (ID) é responsável por 80% da absorção de nutrientes e funciona como uma barreira protetora física e química às substâncias e agentes possivelmente patogênicos, além de atuar na coordenação da resposta imune tanto em humanos quanto em camundongos. Prejuízos no ID em decorrência da subnutrição podem estar correlacionados com a resistência do retardo no crescimento às intervenções dietéticas devido aos prejuízos sobre a disponibilidade, absorção e utilização de nutrientes necessários para um crescimento saudável (Dickson, 2020).

Outro componente do TGI é a gordura mesentérica (GM), responsável pela sustentação e vascularização desse trato, entretanto essa estrutura tem um papel pouco explorado. Sabe-se que além de sua função estrutural, a GM também se associa com a permeabilidade intestinal, a translocação bacteriana e, principalmente, na secreção de mediadores inflamatórios (Zhang et al., 2022). Dados prévios da literatura demonstram que a subnutrição durante a doença de Chron pode induzir hipertrofia e fibrose dos adipócitos da GM, piorando o quadro de *creeping fat*, caracterizado pelo envelhecimento e espessamento da GM e aumento da fibrose (Alvarenga et al.,

2017). É, portanto, evidenciado uma correlação entre subnutrição proteica e a modulação da GM. Essa inter-relação ainda não foi explorada na ausência de doenças inflamatórias. Há, ainda, ausência de investigações sobre as possíveis funções metabólicas da GM durante a subnutrição proteica. Este estudo teve como objetivo investigar os impactos da restrição proteica pós-desmame na morfofunção do ID e da GM em camundongos submetidos a restrição proteica pós-desmame.

METODOLOGIA:

Camundongos machos C57BL/6 do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB) foram mantidos no Biotério setorial do Grupo de Pâncreas Endócrino e Metabolismo, Instituto de Biologia, sob condições controladas de umidade, temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro (luzes acesas das 7h às 19h). Aos 30 dias de vida os camundongos foram divididos em grupo Controle (C), submetido a uma dieta normoproteica de 14% de proteína, e o grupo Restrito (R), submetido a dieta hipoproteica de 6% de proteína durante 90 dias. Foi realizada a avaliação semanal de peso, consumo de água e ração. Aos 120 dias de vida, os animais foram eutanasiados e fragmentos do ID e da GM foram coletados para análise morfológica.

Para experimentação do banho de órgãos, foi utilizado o duodeno imediatamente pós eutanásia. Os tecidos foram equilibrados por 45 minutos sob tensão basal de 1g. A tensão isométrica foi registrada utilizando um sistema PowerLab (ADInstruments, Sydney, Austrália). Em seguida, 80 mM de KCl foram adicionados para avaliar a viabilidade e a contração máxima dos tecidos. Após três lavagens e um período de 45 minutos, avaliou-se a contração ou relaxamento induzido por agonistas (Gomes et al., 2023).

Curvas concentração-resposta cumulativas foram realizadas para carbacol (CCh; 1nM-100 μM) e isoproterenol (1pM-10 μM). As curvas foram analisadas utilizando um modelo sigmoidal para determinação da $p\text{EC}_{50}$ e da resposta máxima ($E_{\text{máx}}$). Os dados foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk, seguido pelo teste t de Student ou teste U de Mann-Whitney ($P < 0,05$), conforme aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEUA nº 5564-1/2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A figura 1 apresenta a mensuração plasmática de albumina e proteínas totais em camundongos C e R após 90 dias de tratamento. Como esperado, a ingestão de dieta hipoproteica induziu hipoalbuminemia e redução da concentração plasmática de proteínas totais em camundongos R quando comparados aos camundongos C ($P < 0,05$; Fig. 1A e B) respectivamente). A restrição proteica também reduziu em 15% o peso corporal final do grupo R, em relação ao C ($P < 0,0001$; Fig. 1C). Os camundongos R apresentaram menor comprimento nasoanal (CNA) e índice de Lee, quando comparados aos C ($P < 0,05$; Fig. 1D e E, respectivamente). Além disso, camundongos R apresentaram redução de 25% no peso da GM, em relação ao grupo C ($P < 0,01$; Fig. 1G e D).

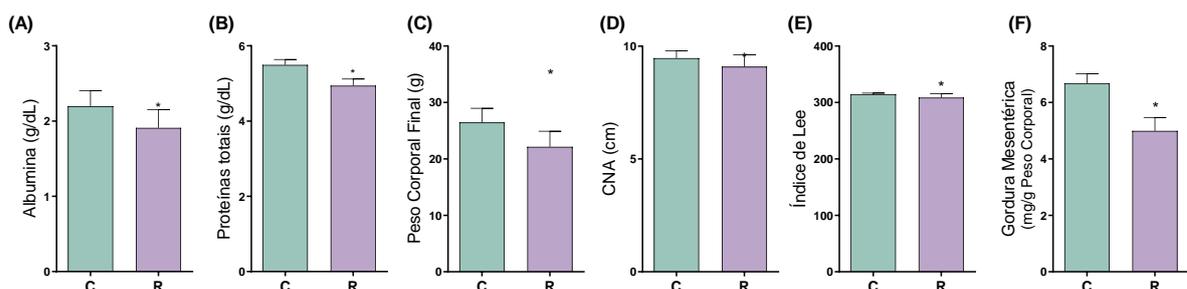


Figura 1: Parâmetros bioquímicos plasmáticos e biométricos em camundongos C e R alimentados com dieta normoproteica ou hipoproteica durante 90 dias. Média \pm EPM dos valores plasmáticos de (A) albumina, (B) proteínas, (C) Peso corporal final, (D) CNA, (E) Índice de Lee e (F) estoque de GM. * Indica diferenças estatísticas em camundongos C (n = 12) e R (n = 12; teste t de Student; $P < 0,05$).

A avaliação morfológica do íleo demonstrou que a subnutrição proteica não alterou a espessura das camadas muscular e submucosa entre os camundongos R em comparação aos camundongos C (Fig. 2AB). Por outro lado, a análise da superfície absorptiva epitelial demonstrou que a subnutrição proteica induziu redução na espessura enquanto aumentou a altura ($P < 0,05$; Fig. 2C e D, respectivamente) das vilosidades sem alterar o número das células caliciformes nessas estruturas no grupo R em relação ao grupo C ($P < 0,05$; Fig. 2H). A análise das criptas intestinais, por outro lado, demonstrou que a restrição proteica reduziu em aproximadamente 24% a profundidade, em 10% o diâmetro enquanto aumentou em 30% a distância dessas estruturas no grupo R em relação ao grupo C ($P < 0,05$; Fig. 1E, F e G, respectivamente). Portanto, até o momento nossos dados indicam que a restrição proteica após o desmame induziu diminuição nos estoques de GM, hipotrofia das criptas intestinais e afinamento das vilosidades no íleo.

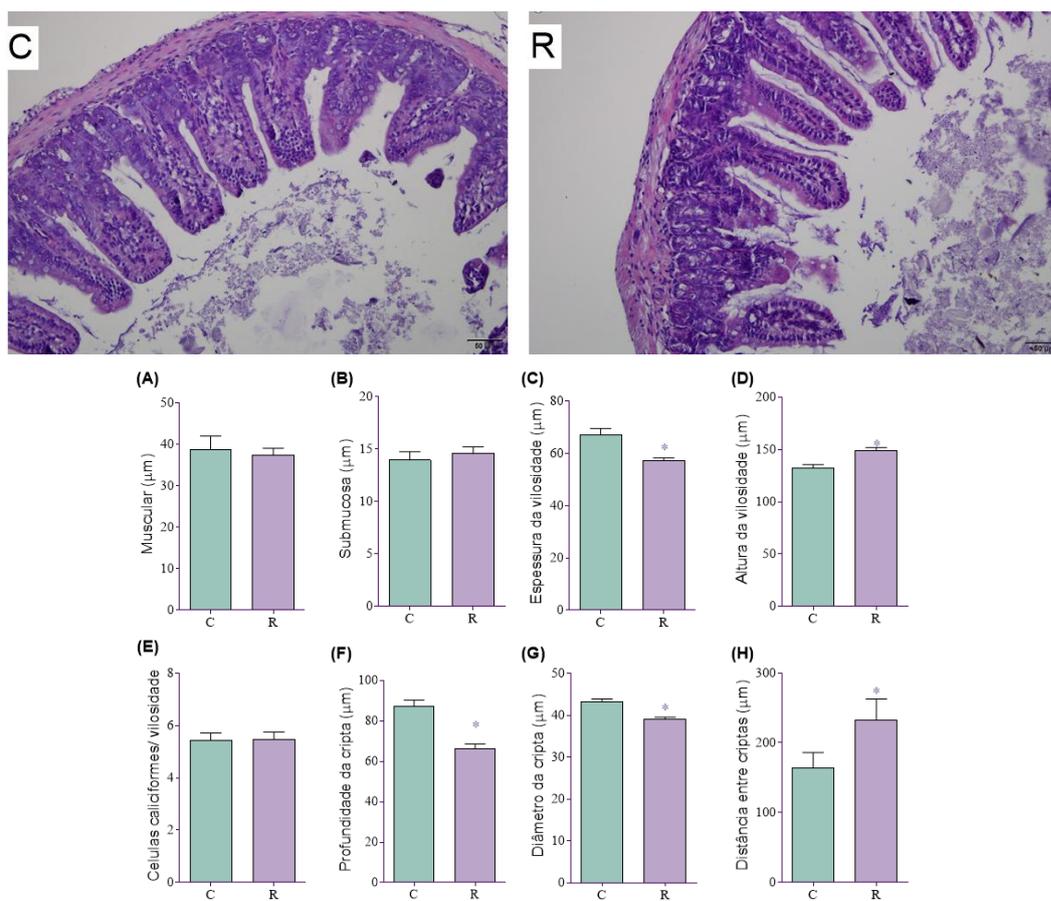


Figura 2: Análise morfológica do íleo em camundongos C e R alimentados com dieta normoproteica ou hipoproteica durante 90 dias. Média ± EPM dos valores da espessura das camadas (A) muscular, (B) submucosa, (C) vilosidades, (D) altura das vilosidades, (E) profundidade das criptas, (F) distância entre criptas e (G) diâmetro das criptas. * Indica diferenças estatísticas em camundongos C (n = 5) e R (n = 5; Mann Whitney; $P < 0,05$).

A GM é formada por células uniloculares e multiloculares. Nesse estoque de tecido adiposo foi realizada uma análise qualitativa do diâmetro e da área total de células multiloculares a fim de avaliar possíveis alterações metabólicas presentes nesse tecido. A GM associada ao jejuno apresentou incremento no número de adipócitos uniloculares na faixa dos 40 à 60 μm de diâmetro no grupo R em comparação ao grupo C, que obteve esse aumento em 65 μm de diâmetro (Fig. 3B). Ainda, a frequência relativa da área dos adipócitos multiloculares de camundongos R aumenta em relação ao grupo C (Fig. 3C) nesse estoque de tecido adiposo. Por fim, o percentual total de adipócitos multiloculares da GM jejunal aumenta duas vezes em camundongos R em comparação aos camundongos C (Fig. 3D). A frequência relativa das células uniloculares da GM ileal aumentou no grupo R na faixa dos 45 à 55 μm de diâmetro quando comparados ao grupo C, que aumentou em 60 à 65 μm (Fig. 4B). Da mesma forma, a frequência relativa e a área dos adipócitos multiloculares aumentaram em camundongos R em relação aos camundongos C (Fig. 4C). Adicionalmente, o grupo R apresentou aumento de três vezes no percentual total de adipócitos multiloculares quando comparado ao grupo C (Fig. 4D).

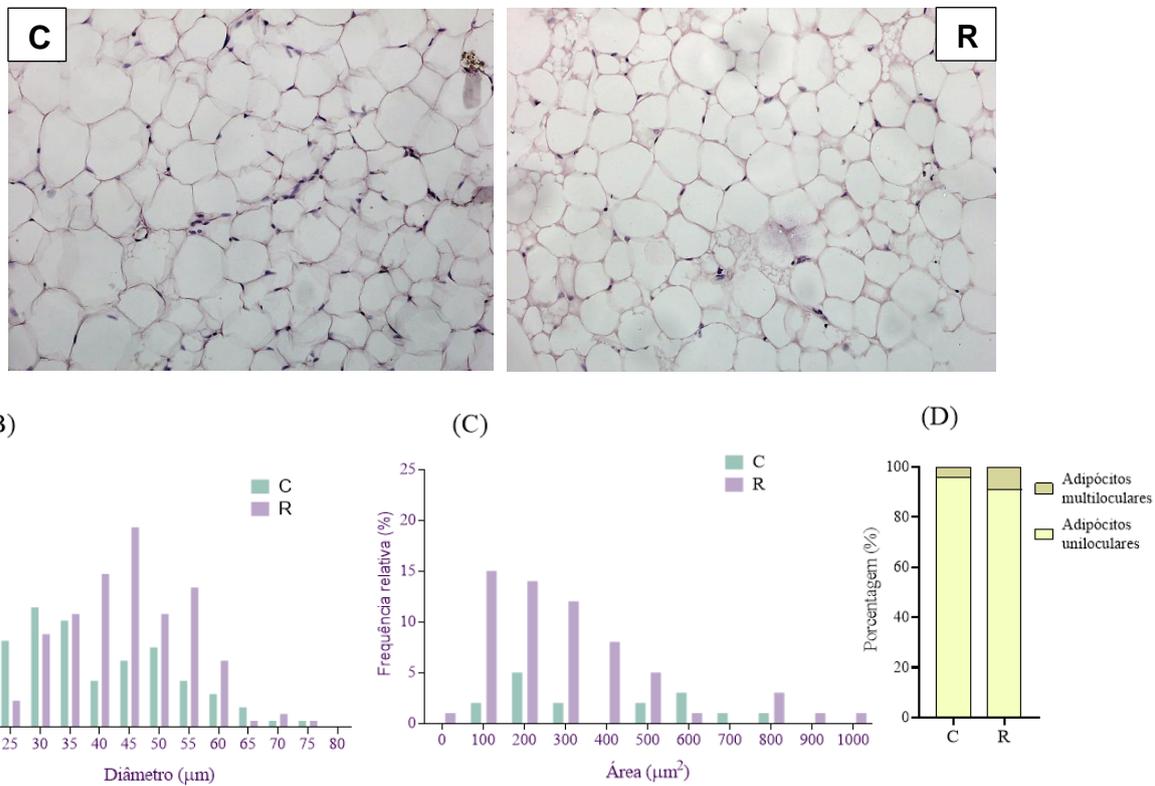


Figura 3. Análise morfológica da GM do jejuno em camundongos C e R alimentados com dieta normoproteica ou hipoproteica durante 90 dias. (A) Imagens representativas da morfologia da GM do jejuno. Média \pm EPM da (B) Frequência relativa do diâmetro dos adipócitos uniloculares da GM, (C) Frequência relativa da área dos adipócitos multiloculares da GM e (D) Porcentagem de adipócitos uniloculares e multiloculares por grupo da GM

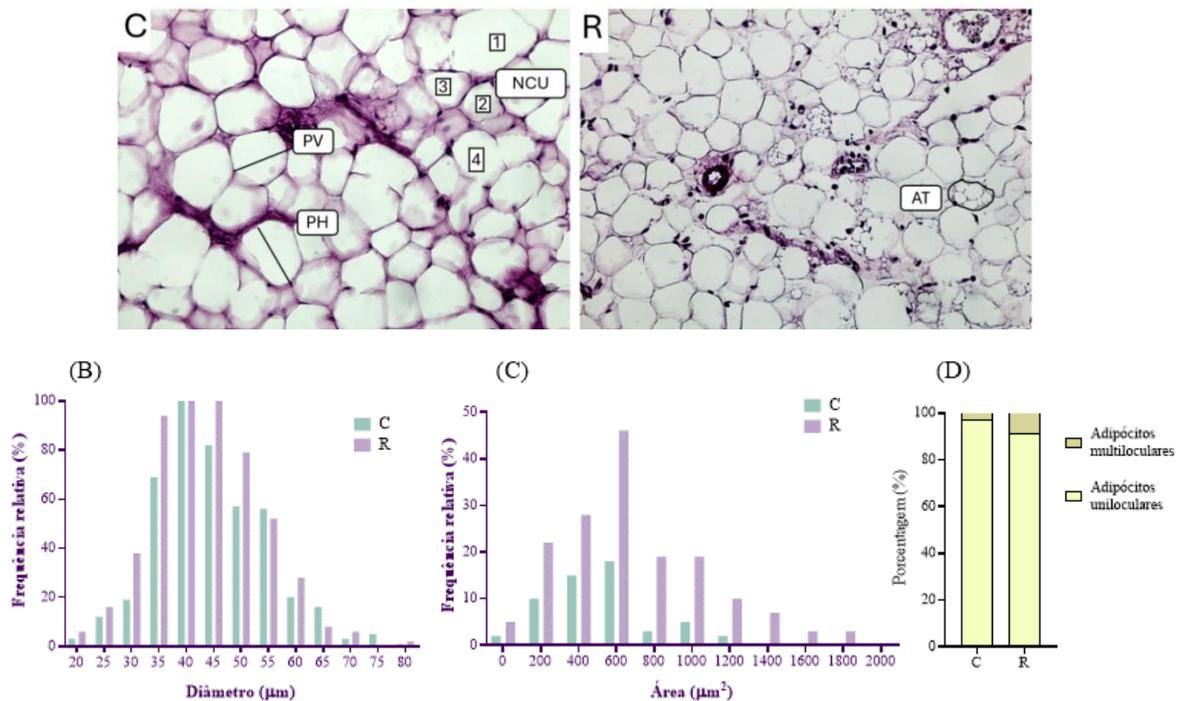


Figura 4. Análise morfológica da GM do íleo em camundongos C e R alimentados com dieta normoproteica ou hipoproteica durante 90 dias. (A) Imagens representativas da morfologia da GM do íleo. Média \pm EPM (B) Frequência relativa do diâmetro dos adipócitos uniloculares da GM, (C) Frequência relativa da área dos adipócitos multiloculares da GM e (D) Porcentagem de adipócitos uniloculares e multiloculares por grupo da GM

A fim de avaliar a motilidade intestinal, foi realizado a experimentação no banho de órgãos com o duodeno. Contrações induzidas por carbacol não apresentaram diferenças significativas entre os grupos R e C, tanto em relação ao pEC_{50} (Fig. 5A) quanto $E_{máx}$ (Fig. 5B), conforme demonstrado pela sobreposição das curvas logarítmicas de resposta (Fig. 5C).

Por outro lado, a análise dos relaxamentos induzidos por isoproterenol revelou um padrão distinto, o pEC_{50} (Fig. 6A) permaneceu inalterado entre os grupos, porem o $E_{máx}$ (Fig. 6B) foi aproximadamente 2,65 vezes maior no grupo R (31,8

± 6,9%) em comparação ao grupo C (11,99 ± 2,74%). Além disso, as curvas de relaxamento demonstraram que o grupo R apresentou uma resposta máxima 3 vezes maior à do grupo C (Fig. 6C), indicando maior sensibilidade ao estímulo β-adrenérgico, sem alterações na potência do agonista.

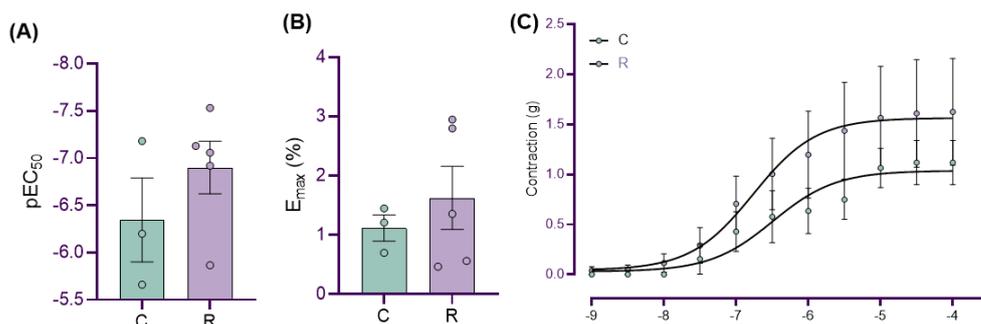


Figura 5. Análise da motilidade intestinal em camundongos C e R alimentados com dieta normoproteica ou hipoproteica durante 90 dias. (A). Média ± EPM do duodeno (A) pEC₅₀ de carbacol em grupo C e R, (B) E_{max} (%) de carbacol em grupo C e R, (C) Curva logarítmica grupo de carbacol C e R (Student's t-test; P < 0.05).

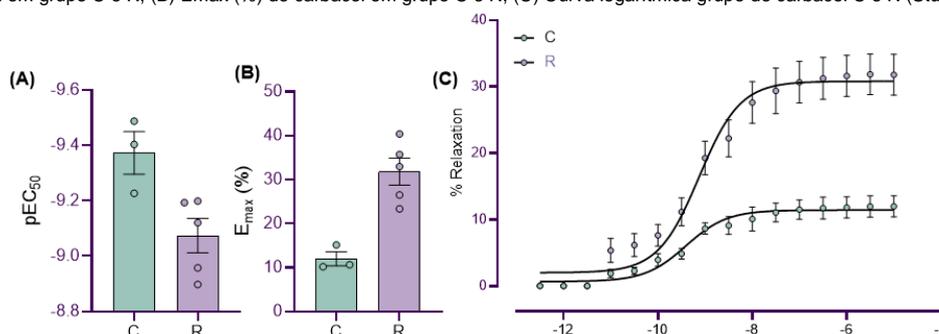


Figura 6. Análise da motilidade intestinal em camundongos C e R alimentados com dieta normoproteica ou hipoproteica durante 90 dias Média ± EPM do duodeno (A) pEC₅₀ de isoproterenol em grupo C e R, (B) E_{max} (%) de isoproterenol em grupo C e R, (C) Curva logarítmica de isoproterenol grupo C e R (Student's t-test; P < 0.05).

CONCLUSÕES:

No ID, a restrição proteica causou alterações estruturais no íleo. Especificamente, houve uma hipotrofia das criptas intestinais, acompanhada por um alongamento das vilosidades. A avaliação funcional do intestino revelou que enquanto as contrações induzidas por carbacol se mantiveram inalteradas, os relaxamentos mediados por receptores β-adrenérgicos foram significativamente potencializados. Simultaneamente, a GM também respondeu à restrição proteica com hipertrofia dos adipócitos uni e multiloculares. Além disso, houve aumento expressivo na proporção de adipócitos multiloculares. Essas modificações sugerem uma reorganização metabólica coordenada em resposta à restrição proteica. A potencialização do relaxamento intestinal induzida via β-adrenérgica pode estar associada às alterações na GM, já que a ativação desses receptores se associa ao metabolismo energético. Essa correlação provavelmente indica um possível mecanismo adaptativo para otimizar a digestão e o uso de energia em um cenário de baixa disponibilidade proteica.

BIBLIOGRAFIA

- FORE, Henrietta H.; DONGYU, Qu; BEASLEY, David M.; GHEBREYESUS, Tedros A. Child malnutrition and COVID-19: the time to act is now. **The Lancet**, [S. l.], v. 396, n. 10250, p. 517–518, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31648-2. Disponível em: [https://www.thelancet.com/article/S0140-6736\(20\)31648-2/fulltext](https://www.thelancet.com/article/S0140-6736(20)31648-2/fulltext).
- THOMPSON, Alex J. et al. Understanding the role of the gut in undernutrition: what can technology tell us? **Gut**, [S. l.], v. 70, n. 8, p. 1580–1594, 2021. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-323609. Disponível em: <https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2020-323609>.
- DICKSON, Iain. Creeping fat in Crohn's disease explained. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S. l.], v. 17, n. 12, p. 713–713, 2020. DOI: 10.1038/s41575-020-00379-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41575-020-00379-0>.
- SORIANO, Sergi et al. Reduced insulin secretion in protein malnourished mice is associated with multiple changes in the β-cell stimulus-secretion coupling. **Endocrinology**, [S. l.], v. 151, n. 8, p. 3543–3554, 2010. DOI: 10.1210/en.2010-0008.
- MARROQUÍ, Laura et al. Functional and structural adaptations in the pancreatic α-cell and changes in glucagon signaling during protein malnutrition. **Endocrinology**, [S. l.], v. 153, n. 4, p. 1663–1672, 2012. DOI: 10.1210/en.2011-1623.
- WHO. **Malnutrition**. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>.
- ZHANG, Haowei et al. Characteristics of mesenteric adipose tissue attached to different intestinal segments and their roles in immune regulation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 322, n. 3, p. G310–G326, 1 mar. 2022.
- ALVARENGA, Ana et al. Superior Mesenteric Artery Syndrome: Weight Loss Can Be a Problem, Weight Gain Can Be a Solution. **GE - Portuguese Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 1, p. 43–46, 2017.