

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

JOÃO VICTOR DAMIN

**ANÁLISE METABOLÔMICA DO LEITE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS À  
DIETA DE RESTRIÇÃO PROTEICO-CALÓRICA DURANTE A LACTAÇÃO**

Maringá  
2026

JOÃO VICTOR DAMIN

**ANÁLISE METABOLÔMICA DO LEITE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS À  
DIETA DE RESTRIÇÃO PROTEICO-CALÓRICA DURANTE A LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Maringá.

Orientadora: Kesia Gemima Palma Rigo Wutzow

Co-orientador: Paulo Cezar de Freitas Mathias

Maringá  
2026

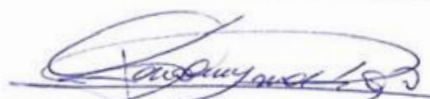
JOÃO VICTOR DAMIN

**ANÁLISE METABOLÔMICA DO LEITE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS À  
DIETA DE RESTRIÇÃO PROTEICO-CALÓRICA DURANTE A LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Maringá.

Aprovada em: 30 / 01 / 2026

**BANCA EXAMINADORA**



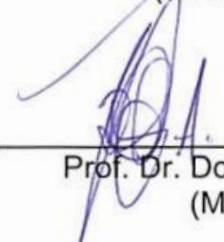
---

Prof. Drª Kesia Gemima Palma Rigo Wutzow  
(Orientadora)



---

Prof. Dr. Sidney Barnabé Peres  
(Membro do programa)



---

Prof. Dr. Douglas Lopes de Almeida  
(Membro externo)

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

D159a

Damin, João Victor

Análise metabolômica do leite de ratas wistar submetidas à dieta de restrição proteico-calórica durante a lactação / João Victor Damin. -- Maringá, PR, 2026.  
56 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Kesia Gemima Palma Rigo Wutzow.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2026.

1. Origens desenvolvimentistas da saúde e doença (DOHaD). 2. Leite de ratas - Metabolômica. 3. Programação metabólica. 4. Metabolismo materno. 5. Lactação e dieta. I. Wutzow, Kesia Gemima Palma Rigo, orient. II. Mathias, Paulo Cezar de Freitas, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Fisiológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

CDD 23.ed. 572.4

## **DEDICATÓRIA**

Gostaria de dedicar este trabalho a todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, durante esse período. Se estou aqui hoje, certamente é por estar sobre ombros de gigantes.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço:

À minha mãe, Mara, por todo incentivo e apoio ao longo de todos esses anos.

A minha companheira Drielli Rhiane, por todo o companheirismo, mas também por sua expertise, conhecimento e ajuda durante este projeto.

À minha orientadora Prof. Dr. Késia Palma-Rigo, por todo o conhecimento e orientação, assim como a sabedoria e ensinamentos.

Ao professor Dr. Paulo Cézar de Freitas Mathias pela coorientação, todo o conhecimento transmitido, o fornecimento de seu laboratório e grupo de pesquisa e apoio financeiro.

Ao grupo de pesquisa LEXDOHaD, por toda ajuda, aprendizado e companheirismo ao longo desses dois anos.

Ao professor Dr. Eduardo Pilau pela ajuda com os equipamentos e disponibilidade de seu laboratório e grupo de pesquisa LabioMass. E aos colegas do LabioMass por toda a ajuda, expertises e companheirismo.

Ao Departamento de Fisiologia, e o programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PFS) pela oportunidade, e apoio financeiro.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa, e a bolsa de formação Mestrado (PIBPG Ciclo 2024 - CHAMADA CNPq Nº 35/2023).

À CAPES, IMSPAM, e novamente ao CNPq pelo financiamento do projeto.

À UEM, pela oportunidade.

DAMIN, João Victor. Análise Metabolômica do leite de ratas wistar submetidas a dieta de restrição proteico-calórica durante a lactação. 2026. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2026.

## RESUMO

O conceito DOHaD (do inglês Developmental Origins of Health and Disease) propõe que exposições ambientais durante fases críticas do desenvolvimento, como a gestação, lactação e puberdade, podem resultar em modificações metabólicas duradouras, predispondo os indivíduos a distúrbios crônicos na vida adulta. A lactação é uma fase crucial de programação metabólica, podendo determinar se um indivíduo terá um fenótipo saudável ou ser mais propenso a doenças, como a síndrome cardiometabólica. Além disso, a dieta pobre em proteínas (LP) altera a composição do leite e afeta o crescimento dos filhotes alterando sua resposta metabólica, podendo induzir sintomas de síndrome cardiometabólica na vida adulta dos filhotes. Apesar de ser uma dieta amplamente utilizada em pesquisas no contexto do conceito DOHaD, pouco se estuda sobre como essa intervenção afeta a saúde materna, especialmente levando em conta que a dieta e saúde da mãe afeta diretamente a composição do leite, impactando o desenvolvimento da prole. Hipotetizamos que a exposição a dieta LP desorganiza o controle cardiometabólico das ratas lactentes e também a composição de metabólitos do seu leite. Portanto o objetivo deste estudo foi realizar uma análise metabolômica do leite de ratas alimentadas com dieta LP e avaliar o perfil cardiometabólico da mãe logo após a lactação, a fim de entender melhor os impactos dessa intervenção na programação metabólica dos filhotes. Para tal, após uma semana de adaptação, foi realizado o cruzamento das fêmeas com machos. Após a confirmação de prenhez as fêmeas foram alocadas em gaiolas individuais e após o nascimento, foram divididas em dois grupos: Controle (C) com dieta comercial padrão de 20,5% de proteína, ou Low-Protein (LP) com 4% de proteína por duas semanas, sendo então expostas novamente a dieta controle. O leite foi coletado nos dias 7, 14 e 21 da lactação para análise metabolômica exploratória. Após a lactação, foram realizadas: a pletismografia de cauda, a fim de determinar a pressão arterial sistólica; os testes de tolerância à insulina (ipITT) e tolerância a glicose (oGTT), para avaliar o metabolismo da

glicose das mães; e eutanásia para coleta e pesagem de tecidos e coleta de sangue total, onde foi avaliado o perfil lipídico e glicemia de jejum. As ratas do grupo LP apresentaram perda de peso durante a intervenção dietética, com um efeito *catch up* após o retorno da dieta padrão. A dieta LP causou aumento de pressão arterial, sensibilidade a insulina e glicemia de jejum, e redução na adiposidade e triglicerídeos nas mães. O estudo de metabolômica revelou diferenciação clara entre os leites de cada grupo. A análise de *K-means* mostrou padronização consistente na formação dos *clusters*, com as amostras do grupo LP se agrupando de um lado e o C do outro, comprovando diferença significativa entre o leite de cada grupo. O grupo LP mostrou aumento nos níveis de progesterona, nicotinamida, LPE 18:0 e SM 18:1;O2/16:0 nos dias 7 e 14 de coleta, assim como redução de 17-beta-Estradiol durante o mesmo período. Em conjunto, os resultados demonstram que a dieta hipoproteica durante a lactação induz alterações significativas no perfil cardiometabólico materno e na composição de metabólitos do leite, incluindo modificações hormonais e lipídicas, especialmente nas fases iniciais da lactação.

Palavras-Chave: DOHaD; Programação metabólica; Metabolômica; LP.

DAMIN, João Victor. Metabolomic analysis of milk from Wistar rats fed a protein-caloric restricted diet during lactation. 2026. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2026.

## **ABSTRACT**

The DOHaD concept (Developmental Origins of Health and Disease) proposes that environmental exposures during critical periods of development, such as gestation, lactation, and puberty, can result in long-lasting metabolic modifications, predisposing individuals to chronic disorders in adulthood. Lactation is a crucial period of metabolic programming, potentially determining whether an individual develops a healthy phenotype or becomes more susceptible to conditions such as cardiometabolic syndrome. In addition, a low-protein (LP) diet alters milk composition and affects offspring growth by modifying their metabolic responses, potentially inducing cardiometabolic syndrome–related symptoms in adulthood. Despite being widely used in DOHaD models, little is known about how this intervention affects maternal health, particularly considering that maternal diet and health directly influence milk composition and, consequently, offspring development. Therefore, the aim of this study was to perform a metabolomic analysis of the milk from dams fed a LP diet and to evaluate the maternal cardiometabolic profile immediately after lactation, in order to better understand the impact of this intervention on offspring metabolic programming. After one week of adaptation, females were mated with males. Following pregnancy confirmation, dams were housed individually and, after delivery, divided into two groups: Control (C), fed a standard commercial diet containing 20.5% protein, or Low-Protein (LP), with 4% protein diet for two weeks, after which all animals were returned to the control diet. Milk samples were collected on lactation days 7, 14, and 21 for exploratory metabolomic analysis. After lactation, tail plethysmography was performed, to determine systolic blood pressure, along with intraperitoneal insulin tolerance (ipITT) and oral glucose tolerance (oGTT) tests to assess maternal glucose metabolism. Animals were then euthanized for tissue and blood collection, allowing evaluation of lipid profile and fasting glycemia. LP dams exhibited weight loss during the dietary intervention, followed by a catch-up effect after returning to the standard diet. The LP diet increased blood pressure, insulin sensitivity,

and fasting glycemia, while reducing adiposity and triglyceride levels in the dams. Metabolomic analysis revealed a clear differentiation between milk samples from each group. *K-means* analysis showed consistent clustering, with LP samples grouping separately from controls, confirming significant differences in milk composition. The LP group exhibited increased levels of progesterone, nicotinamide, LPE 18:0, and SM 18:1;O2/16:0 on lactation days 7 and 14, as well as reduced levels of 17 $\beta$ -estradiol during the same period. Overall, these results demonstrate that a low-protein diet during lactation induces significant alterations in the maternal cardiometabolic profile and in milk metabolomic composition, particularly during the early stages of lactation.

Keywords: DOHaD; Metabolic programming; Metabolômico; LP.



## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

|              |                                             |
|--------------|---------------------------------------------|
| <b>CCB</b>   | Centro de Ciências Biológicas               |
| <b>DFS</b>   | Departamento de Ciências Fisiológicas       |
| <b>UEM</b>   | Universidade Estadual de Maringá            |
| <b>PC</b>    | Peso Corporal                               |
| <b>DOHaD</b> | Developmental Origins of Health and Disease |
| <b>LP</b>    | Low Protein                                 |
| <b>HPA</b>   | Hypothalamico–Pituitario–Adrenal            |
| <b>HPG</b>   | Hypothalamico–Adrenal–Gonadal               |
| <b>LPC</b>   | Lisofosfatidilcolina                        |
| <b>LPE</b>   | Lisofosfatidiletanolamina                   |
| <b>SM</b>    | Esfingomielina                              |
| <b>DG</b>    | Diacilglicerol                              |
| <b>PC</b>    | Fosfatidilcolina                            |
| <b>TG</b>    | Triacilglicerol                             |
| <b>PCA</b>   | Principal Component Analysis                |



## SUMÁRIO

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                    | 6  |
| <b>2 OBJETIVOS</b>                                                     | 8  |
| 2.1 OBJETIVO GERAL                                                     | 8  |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                              | 8  |
| <b>3 MATERIAIS E METODOS</b>                                           | 9  |
| 3.1 MATERIAL E MÉTODOS                                                 | 9  |
| 3.1.1 Animais, condições experimentais e dieta                         | 9  |
| 3.1.2 Modelo Experimental                                              | 9  |
| 3.1.3 Composição da dieta LP                                           | 10 |
| 3.1.4 Coleta do leite                                                  | 11 |
| 3.1.5 Análise metabolômica do leite por UHPLC-MS/MS                    | 11 |
| 3.1.6 Processamento de dados de espectrometria de massas               | 12 |
| 3.1.7 Parâmetros biométricos                                           | 13 |
| 3.1.8 Pletismografia de cauda                                          | 13 |
| 3.1.9 Metabolismo da glicose                                           | 13 |
| 3.1.10 Eutanásia e coleta de tecidos                                   | 14 |
| 3.1.11 Dosagens Bioquímicas                                            | 15 |
| 3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA                                                | 15 |
| <b>4 RESULTADOS</b>                                                    | 15 |
| Ingesta e peso                                                         | 15 |
| Metabolismo da glicose                                                 | 17 |
| Pressão Arterial                                                       | 18 |
| Parâmetros biométricos e bioquímicos                                   | 18 |
| Peso da Ninhada                                                        | 19 |
| Análise Metabolômica do leite                                          | 20 |
| <b>5 DISCUSSÃO</b>                                                     | 27 |
| <b>6 CONCLUSÃO</b>                                                     | 34 |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                                     | 36 |
| <b>APÊNDICE A – Método de cotovelo</b>                                 | 42 |
| <b>APÊNDICE B – Espectros de fragmentação dos metabólitos anotados</b> | 43 |

## 1 INTRODUÇÃO

O conceito DOHaD (do inglês *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD)), introduzido por Barker (1986), propõe que estresses ambientais diversos que ocorrem em fases “sensíveis” do desenvolvimento do indivíduo, em que ele ainda apresenta plasticidade neural e metabólica podem produzir efeitos duradouros no organismo. Alguns exemplos de fases consideradas sensíveis seriam a gestação, lactação e puberdade. Estresses nessas fases podem influenciar o metabolismo, aumentando a propensão para o aparecimento de distúrbios metabólicos. Por conta disso, esse fenômeno vem sendo conhecido como programação metabólica (GLUCKMAN; HANSON, 2007).

A amamentação é de extrema importância para a prole de mamíferos, e já foi demonstrado que pode ser uma janela de programação metabólica para os filhotes (SILVEIRA *et al*, 2007). Essa janela tem um potencial para programar o adulto para uma condição saudável ou de maior risco para desenvolver a síndrome metabólica (PICÓ *et al*, 2020). Já se sabe que a dieta materna tem influência direta na composição do leite, tanto no teor de vitaminas (BRAVI, 2016), quanto o de hormônios (PICÓ *et al*, 2020).

A dieta pobre em proteína (*Low-Protein* – LP) é bastante utilizada em pesquisas no contexto do conceito DOHaD, e se encontra bem descrita na literatura (HOFFMAN; REYNOLD; HARDY, 2017; RAMIREZ *et al*, 2023). Filhotes de mães que receberam dieta LP durante a gestação e lactação apresentam menor crescimento e peso, menor concentração de proteínas totais no soro aos 30 dias de vida, e pressão arterial aumentada nos 90 dias (de BRITO ALVES, 2014). Diante da exposição apenas durante a lactação, foi demonstrado que, aos 80 dias de vida, a secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas dos filhotes apresenta reduzida resposta a glicose devido alteração no sistema nervoso autônomo (GRAVENA, 2013). De acordo com Martins e colegas (2023) a dieta LP é capaz de modificar os conteúdos de proteínas e lipídios no leite, e aumentar sua quantidade de corticosterona quando comparado com o leite controle.

A capacidade que a lactação apresenta para programação metabólica exalta a necessidade de se estudar a composição do leite, e a técnica de metabolômica atende a esta demanda. A metabolômica pode ser definida como “a medida quantitativa da resposta metabólica dinâmica dos sistemas biológicos após um determinado estímulo

fisiológico ou genético” (NICHOLSON, 1999). Esta técnica auxilia no entendimento do funcionamento celular dos organismos e avalia alterações biológicas (CANUTO, 2018). Muitos estudos já utilizam a metabolômica como uma ferramenta para estudar o leite em outros animais, como vacas, cabras e até humanas, (MARINCOLA *et al*, 2015; CABONI *et al*, 2019; BOUDONCK, 2009; ROCCHETTI *et al*, 2020), porém poucos estudos, segundo nosso conhecimento, trabalharam com o leite de ratas.

Palou e colegas (2020) estudaram o leite de ratas submetidas a uma dieta de restrição calórica, e observaram diferenças no perfil de metabólitos, quando comparados com o grupo controle. Nesse estudo análises adicionais ainda revelaram diferenças significativas em hormônios como adiponectina e irisina, e algumas vitaminas como myo-inositol, porém ainda não há estudos de metabolômica de leites de ratas no modelo dietético LP. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi realizar a análise metabolômica exploratória dos leites de ratas alimentadas com dieta LP durante a lactação, e avaliar os parâmetros cardiometabólicos das mães após o final da lactação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar os efeitos da dieta de restrição proteico-calórica no leite das mães durante a lactação e no seu perfil cardiometabólico após a lactação.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1** Avaliar consumo alimentar e peso corporal durante a lactação.

**2.2.2** Determinar o peso dos estoques de gordura ovariana, uterina, retroperitoneal e mesentérica;

**2.2.3** Determinar o perfil lipídico e glicemia de jejum das ratas lactentes;

**2.2.4** Avaliar as concentrações de glicose no plasma de animais submetidos ao teste de tolerância à glicose via oral (oGTT);

**2.2.5** Determinar a tolerância a glicose de animais submetidos ao teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT);

**2.2.6** Determinar a pressão arterial sistólica de cada grupo por pletismografia de cauda;

**2.2.7** Realizar a análise de metabolômica exploratória do leite das ratas nos dias de coleta 7, 14, 21;

**2.2.8** Fazer a anotação dos compostos a partir dos espectros de fragmentação utilizando banco de dados;

**2.2.7** Realizar uma análise estatística dos compostos de interesse anotados a partir da metabolômica exploratória.

**2.2.7** Realizar o acompanhamento do peso dos filhotes ao longo da lactação.

### 3 MATERIAIS E METODOS

#### 3.1 MATERIAL E MÉTODOS

##### 3.1.1 Animais, condições experimentais e dieta

Foram utilizados ratos Wistar, criados no biotério central da Universidade Estadual de Maringá. Ratas Wistar (n=24) entre 80 e 90 dias de vida foram transportadas junto com machos (n=12) para cruzamento, para o Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular da Secreção, vinculado ao Departamento de Genéticas, Biotecnologia e Biologia Celular. Os animais foram mantidos em uma sala controlada, com temperatura constante de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas (7:00-19:00 horas, período claro), com acesso livre à água e ração (Nuvital®, Curitiba, Brasil). Todos os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com as normas da CEUA e do Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA nº 5126101125).

##### 3.1.2 Modelo Experimental

Após a chegada ao Biotério Setorial, os animais passaram por um período de adaptação de uma semana onde não houve nenhuma intervenção. Ao final dos 7 dias as ratas foram submetidas ao cruzamento com os machos, em uma proporção de um macho para duas fêmeas, por caixa. A partir da confirmação de prenhez das fêmeas, elas foram encaminhadas para caixas individuais.

O dia do nascimento dos animais foi considerado o dia 0, e não houve nenhuma intervenção neste dia. No dia 1 foi atribuída a devida dieta a rata (*ad libitum*), assim como realizada a pesagem de água, comida e da mãe, e no dia 2 foi realizada a padronização e pesagem da ninhada, sendo padronizado 9 filhotes por mãe (os filhotes não utilizados durante a padronização de ninhada foram eutanasiados com uma overdose anestésica de cetamina (300mg/kg) e xilazina (30mg/kg)). Os animais foram então divididos em 2 grupos de 12 fêmeas, totalizando 24 animais: o grupo Controle (C), alimentado com ração comercial padrão Nuvital® (20,5% de proteína); e o grupo Low Protein (LP), alimentado com ração hipoproteica (4% de proteínas) (Tabela 1). As intervenções dietéticas foram realizadas exclusivamente durante a lactação, sendo que no grupo C, foi até o último dia da lactação e o grupo LP apenas

até o dia 14, devido a sua alta restrição proteica, sendo a dieta então substituída por uma dieta comercial padrão.

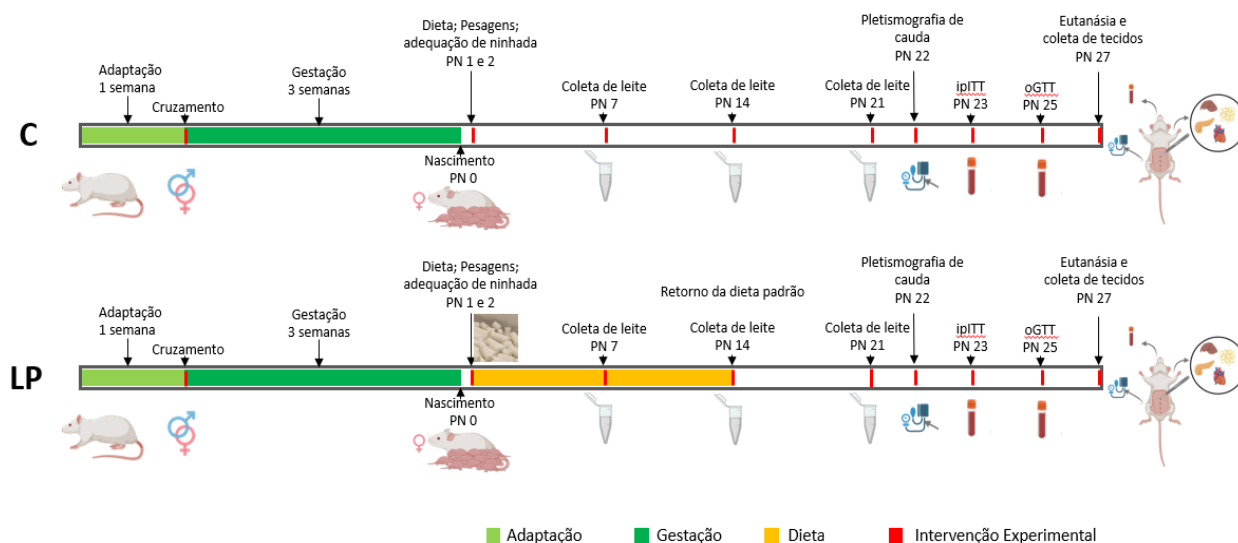


FIGURA 1: Delineamento experimental.

O leite das fêmeas foi coletado em três momentos da lactação, sendo eles nos dias 7, 14 e 21, conforme descrito abaixo. Ao final da lactação, no dia 21 os filhotes foram separados das mães. Foi então realizada a pletismografia de cauda no dia 22, para aferição da pressão arterial das mães, seguido do ipITT no dia 23, o oGTT no dia 25 e por fim foi realizada a eutanásia e coleta de tecidos desses animais no dia 27 (Figura 1).

### 3.1.3 Composição da dieta LP

TABELA 1: composição da dieta LP.

| Componentes              | Dieta LP (4%) |
|--------------------------|---------------|
| Sacarose                 | 20,00         |
| Amido de Milho           | 64,25         |
| Caseína (88% proteína)   | 4,55          |
| Mistura de Sais Minerais | 3,20          |
| Mistura de Vitaminas     | 1,60          |
| Óleo de Soja             | 4,80          |
| Óleo de fígado de peixe  | 1,60          |

### 3.1.4 Coleta do leite

A coleta do leite foi realizada nos dias 7, 14 e 21 da lactação. As ratas de cada grupo (n=12 por grupo) foram separadas dos filhotes por um período de 2 horas para acúmulo de leite nas glândulas mamárias. Para a coleta do leite foi realizada uma ordenha, nas lactantes anestesiadas com a mistura de anestésicos, Cetamina-xilazina (75 mg + 15 mg/kg, i.m). Posteriormente foi realizada a aplicação de ocitocina sintética (Oxytocin®, Chemical Union, Embu, São Paulo, Brazil) na dosagem de 2,5 UI/kg de peso corporal, i.p., para estimular a secreção do leite. A ordenha foi realizada através de massagem manual das tetas e o leite foi coletado com uma pipeta graduada. A quantidade coletada foi de aproximadamente 500 µL de leite. Essas amostras foram coletadas em microtubos estéreis e armazenadas em -80 °C para posterior dosagens.

### 3.1.5 Análise metabolômica do leite por UHPLC-MS/MS

Alíquotas de 100 µL das amostras foram submetidas ao processo de extração líquido-líquido utilizando acetato de etila, com o auxílio de agitador tipo vórtex, realizando-se três extrações consecutivas, cada uma empregando 100 µL de solvente. Após centrifugação, as fases foram separadas, sendo a fase orgânica coletada para a obtenção da fração em acetato de etila. As frações orgânicas foram evaporadas sob fluxo de N<sub>2</sub> e posteriormente reconstituídas em 350 µL de metanol (grau HPLC), sendo então empregadas nas análises subsequentes por UHPLC-MS/MS.

As análises de UHPLC-MS/MS foram realizadas no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), DQI/UEM, em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UHPLC), marca Shimadzu, acoplado a espectrômetro de massas com analisador quadrupolo-Tempo de voo, em inglês quadrupole time of flight mass spectrometer (QTOF) da marca Bruker, modelo Impact II. O software de processamento de dados foi o Data analysis 4.3, Bruker. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando UHPLC, com coluna de fase reversa, XSelect HSS T3, Waters.

A análise dos dados gerados e posterior caracterização dos metabólitos conhecidos presentes nas amostras foi baseada nos perfis de fragmentação de cada classe de metabólitos, em comparação com bancos de dados espectrais públicos e dados da literatura. O cálculo de exatidão de massa foi feito através da **Equação 1**.

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{(\text{Massa exata teórica}) - (\text{Massa exata observada})}{\text{Massa exata teórica}} \times 10^6$$

EQUAÇÃO 1: Cálculo do erro a partir do valor de massa exata.

### 3.1.6 Processamento de dados de espectrometria de massas

Os dados de espectrometria de massas obtidos foram previamente convertidos para o formato .mzML. O processamento foi conduzido no software R, com auxílio do RStudio para visualização da pipeline, com os pacotes MSnbase, xcms, MASS, Spectra e CAMERA. Inicialmente, foi gerado o cromatograma com as amostras de controle de qualidade (QC) para avaliação da estabilidade instrumental. A seguir, foram testados e ajustados os parâmetros do algoritmo CentWave para detecção de picos cromatográficos por meio da função findChromPeaks.

Após essa etapa, seguiu-se o fluxo proposto pelo pacote xcms, que inclui: agrupamento inicial dos picos (groupChromPeaks), correção do tempo de retenção (adjustRtime), novo agrupamento, e preenchimento dos picos ausentes (fillChromPeaks). A adição de informações sobre adutos e isótopos foi realizada com o pacote CAMERA, permitindo a anotação de possíveis compostos redundantes. Com a matriz de intensidades gerada, realizou-se a filtragem de contaminantes previamente conhecidos (GATTO; GIBB; RAINER, 2020; GATTO; LILLEY, 2012).

A matriz final de dados foi então submetida à análise de componentes principais (PCA), visando a identificação de padrões de agrupamento entre as amostras. Os *scores* e *Loadings* obtidos foram plotados em vetores bidimensionais no R, permitindo a visualização das principais fontes de variância nos dados. Dos compostos anotados, foram selecionados aqueles de interesse biológico e realizado uma análise por *Heatmap* com hierarquia.

A PCA é um método estatístico não supervisionado que projeta variáveis correlacionadas em um novo espaço ortogonal, onde cada componente captura máxima variância dos dados. Os *scores* representam as amostras nesse espaço reduzido, enquanto os *Loadings* indicam quais variáveis influenciam mais cada componente, auxiliando na identificação de padrões e agrupamentos (NYAMUNDANDA; BRENNAN; GORMLEY, 2010).

### **3.1.7 Parâmetros biométricos**

Durante toda a duração experimental, a ingesta hídrica e consumo alimentar dos animais foram registrados a cada 2 dias e a aferição da evolução ponderal foi realizada sempre no dia de coleta de leite, sendo a pesagem da ninhada realizada no dia seguinte, e com todos os 9 filhotes para obter o peso total da ninhada. A coleta de sangue total foi realizada pela eutanásia por decaptação utilizando a guilhotina afiada (Insight, Riberão Preto). Posteriormente os animais foram laparatomizados para a coleta dos estoques de gordura retroperitoneal, mesentérica, uterina e ovariana, sendo então pesadas e expressas em relação a 100g de peso corporal (PC) do respectivo animal (g/100g PC).

### **3.1.8 Pletismografia de cauda**

Todos os animais tiveram sua pressão arterial avaliada por pletismografia de cauda ao dia 22. Os animais foram adaptados para a pletismografia, sendo expostos a luz infravermelha aquecida durante 20 minutos durante uma semana.

Para a realização da pletismografia os animais foram colocados em uma caixa aquecida com luz infravermelha por 10 minutos para dilatação da artéria caudal. Posteriormente foi colocado o cuff de insuflação e um sensor de pulso na região da artéria caudal do rato para aferir o pulso arterial. Esse cuff e sensor são conectados a transdutores ligados a amplificadores de sinais BP-100, que estavam conectados ao PowerLab/400, e suas aferições foram registradas em forma de gráficos utilizando o software LabChart7 (AD Instruments). Para determinar a medida da pressão arterial sistólica (PAS) do animal foi calculado uma média usando três aferições consecutivas com o pletismógrafo.

### **3.1.9 Metabolismo da glicose**

Após um jejum de 6 horas, todos os animais receberam uma injeção intraperitoneal de insulina (1U/kg PC) para o teste de tolerância a insulina intraperitoneal (ipITT). Foram obtidas amostras de sangue (75 uL) por meio de tubo capilar heparinizado (75mm de comprimento, 1,5mm de diâmetro externo). O sangue foi coletado por via caudal nos tempos, 0 (antes da injeção), 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração de insulina. As mostras coletadas foram centrifugadas a 13000

rotações por 5 minutos e o plasma coletado e armazenado em -20 °C. As análises dos níveis de glicose sanguínea foram avaliadas por método enzimático-colorimétrico (GoldAnalisa®; Belo Horizonte, Brasil).

Dois dias após o ipITT, foi realizado o teste de tolerância à glicose via oral (oGTT), para que haja a recuperação dos animais. O teste foi realizado com um jejum de 12 horas. Foram coletadas as amostras de sangue por via caudal (tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos) por meio de tubo capilar (75mm de comprimento, 1,5mm de diâmetro externo) heparinizado, logo após os grupos receberem glicose via oral, por gavagem (1U/kg PC). As mostras coletadas foram centrifugadas a 13000 rotações por 5 minutos e o plasma coletado e armazenado em -20 °C.

A dosagem da glicose plasmática foi realizada através do método enzimático-colorimétrico (GoldAnalisa®; Belo Horizonte, Brasil). Reagente de cor foi adicionado às amostras de plasma e incubado por 10 minutos a 37°C em banho-maria para determinação da glicose plasmática (BERGMEYER, 1974). Usando um espectrofotômetro (Analisador bioquímico semi-automático, BIO 200FL, Bio Plus®, São Paulo/SP, Brasil) foram realizadas as leituras da absorbância das amostras.

As análises de perfil lipídico e glicose de jejum (12 horas) foram feitas com o sangue total coletado durante a eutanásia, logo após a decapitação, em um microtubo do tipo Eppendorf® heparinizado para plasma. As mostras coletadas foram centrifugadas a 13000 rotações por 5 minutos e o plasma coletado e armazenado em -20 °C.

### **3.1.10 Eutanásia e coleta de tecidos**

A eutanásia foi realizada por rápida decapitação por guilhotina afiada (Insight, Ribeirão Preto) específica para roedores, sem aplicação de anestesia. O uso da guilhotina, um método restrito de eutanásia, foi necessário devido interferências dos anestésicos, em doses letais, que causam alterações sobre o metabolismo glicêmico e lipídico, parâmetros fundamentais para este trabalho (SAHA *et al*, 2005; WINDELOV *et al*, 2016; DE OLIVEIRA *et al*, 2013).

Logo após a eutanásia o sangue total foi coletado e centrifugado (3000 rpm por 5 min), e o plasma foi coletado e armazenado a -20°C para posterior dosagens bioquímicas. O fígado, o pâncreas, o coração e ovários e as gorduras retroperitoneal, uterina, ovariana e mesentérica foram coletados e pesados. Os filhotes foram

eutanasiados ao final da lactação por rápida decapitação por guilhotina afiada (Insight, Ribeirão Preto).

### 3.1.11 Dosagens Bioquímicas

Utilizando as amostras de sangue total coletados durante a eutanásia foram determinados os níveis plasmáticos basais de colesterol, triglicerídeos e glicose. A glicemia de jejum foi dosada, através do método da glicose oxidase por espectrofotometria (Analisador bioquímico semiautomático, BIO 200FL, BioPlus®, São Paulo/SP, Brasil), utilizando kit comercial (GoldAnalisa®, Belo Horizonte/MG, Brasil). O colesterol e os triglicerídeos foram dosados pelo método colorimétrico utilizando kits comerciais (GoldAnalisa®, Belo Horizonte/MG, Brasil), sendo suas leituras realizadas em equipamento de espectrofotometria (Analisador bioquímico semiautomático, BIO 200FL, BioPlus®, São Paulo/SP, Brasil).

## 3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados desse estudo foram processados usando o programa GraphPadPrism 8 (GraphPad softwares, La Jolla, CA, USA). Os resultados foram apresentados como media  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Foram considerados significativos os resultados que apresentarem  $p < 0,05$ . Foram utilizados teste de normalidade, seguido de teste *t student* paramétrico ou não-paramétrico, a depender do resultado da normalidade. Quando os fatores dieta e tempo afetam a análise, foi utilizado o teste *Two-way ANOVA*, seguido de pós-teste com múltiplas comparações de Sidak. As análises estatísticas da avaliação metabolômica foram realizadas utilizando o RStudio Software, como descrito anteriormente no subtítulo 3.1.7. Foi realizado análises de: hierarquia, produzindo um Dendrograma de agrupamento hierárquico; análise de componentes principais, sendo gerado um gráfico de PCA sobreposto a seus *Loadings*; PCA aliado a *K-means*; e *heatmap* com os compostos de interesse.

## 4 RESULTADOS

### Ingesta e peso

Na figura 2A, o teste *Two-way ANOVA* mostra uma interação significativa entre os fatores tempo e dieta ( $p < 0,001$ ), com o grupo LP apresentando um consumo

reduzido durante toda a lactação, seguido de um *catch-up* após o dia 14. Esse perfil é melhor visualizado através da análise de área sob a curva, onde o grupo LP apresentou um consumo alimentar 74% menor durante a intervenção dietética (Figura 2B:  $p<0.001$ ) e consequentemente também apresentou uma redução no seu peso (Figura 2E:  $p<0.001$ ) neste período. Apesar de um aumento no consumo e peso após o retorno da dieta no dia 14, a área sob a curva de consumo (Figura 2C:  $p<0.001$ ) se manteve 31% menor, e de peso (Figura 2F:  $p<0.001$ ) 26% menor até o dia 21 quando comparado com o grupo controle. Apesar deste resultado, quando feita a avaliação estatística ponto-a-ponto pelo pós-teste é possível observar que o consumo no dia 21 da lactação se igualou ao do grupo controle (Figura 2A:  $p=0.38$ ). O peso desses animais no dia 21, porém ainda se manteve reduzido, sendo 14,1% menor que o grupo controle (Figura 2D:  $p=0.002$ ).

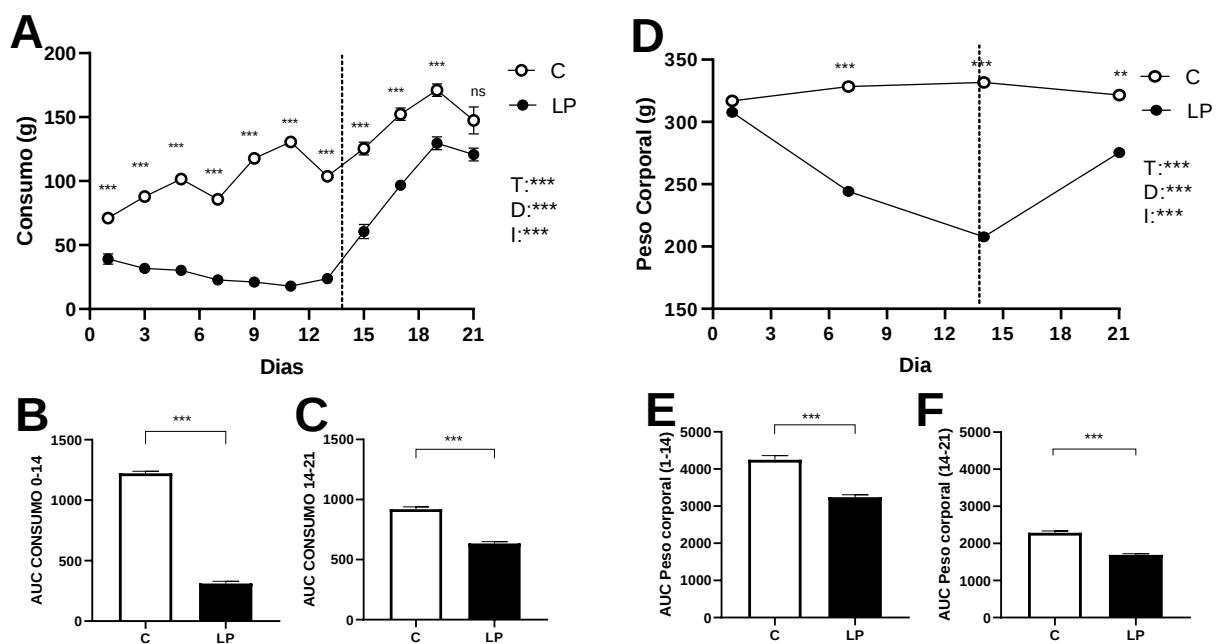


FIGURA 2: Dados de consumo e peso ao longo da lactação. **A**: gráfico de consumo ponto-a-ponto ao longo da lactação dos grupos C (n=9) e LP (n=9). Fator tempo (T)  $p<0.001^{***}$ , fator dieta (D)  $p<0.001^{***}$ , e interação (I)  $p<0.001^{***}$ . **B**: Área sob a curva de consumo do dia 1 ao 14 ( $p<0.001^{***}$ ), C:  $1222\pm17,3$ ; LP:  $310\pm19,9$ . **C**: Área sob a curva de consumo do dia 14 ao 21 ( $p<0.001^{***}$ ), C:  $912,2\pm20,8$ ; LP:  $633,8\pm15,3$ . **D**: gráfico de progressão de peso ponto-a-ponto ao longo da lactação dos grupos controle (n=9) e LP (n=8). Fator tempo (T)  $p<0.001^{***}$ , fator dieta (D)  $p<0.001^{***}$ , e interação (I)  $p<0.001^{***}$ . **E**: Área sob a curva de progressão de peso do dia 1 ao 14 ( $p<0.001^{***}$ ), C:  $4246\pm114,5$ ; LP:  $3239\pm69,3$ . **F**: Área sob a curva de consumo dos dias 14 ao 21 ( $p<0.001^{***}$ ), C:  $2287\pm49,8$ ; LP:  $1691\pm33,6$ .

## Metabolismo da glicose

Os animais alimentados com a dieta LP nos primeiro 14 dias de lactação apresentaram um aumento na sensibilidade da insulina com o aumento de 22% na constante de decaimento do ipITT (kITT, Figura 3B:  $p=0.004$ ). O teste *Two-way* ANOVA do ipITT (Figura 3A), mostrou um efeito significativo do fator dieta ( $p=0.003$ ) e do fator tempo ( $p<0.0001$ ), assim como uma interação significativa dos dois fatores ( $p<0.0001$ ), apontando que os fatores tem impacto distinto no decaimento da glicemia no ipITT. Este perfil é evidenciado por uma queda maior na curva glicêmica dos animais LP ao longo de todo o período de análise, como evidenciado pelo pós-teste. O teste *Two-way* ANOVA do oGTT apresentou diferença significativa apenas no efeito tempo (Figura 3C:  $p<0.0001$ ), indicando que a dieta LP não afetou a tolerância à glicose desses animais. A área sob a curva do oGTT também não apresentou diferença significativa (Figura 3D:  $p\approx 0.25$ ).

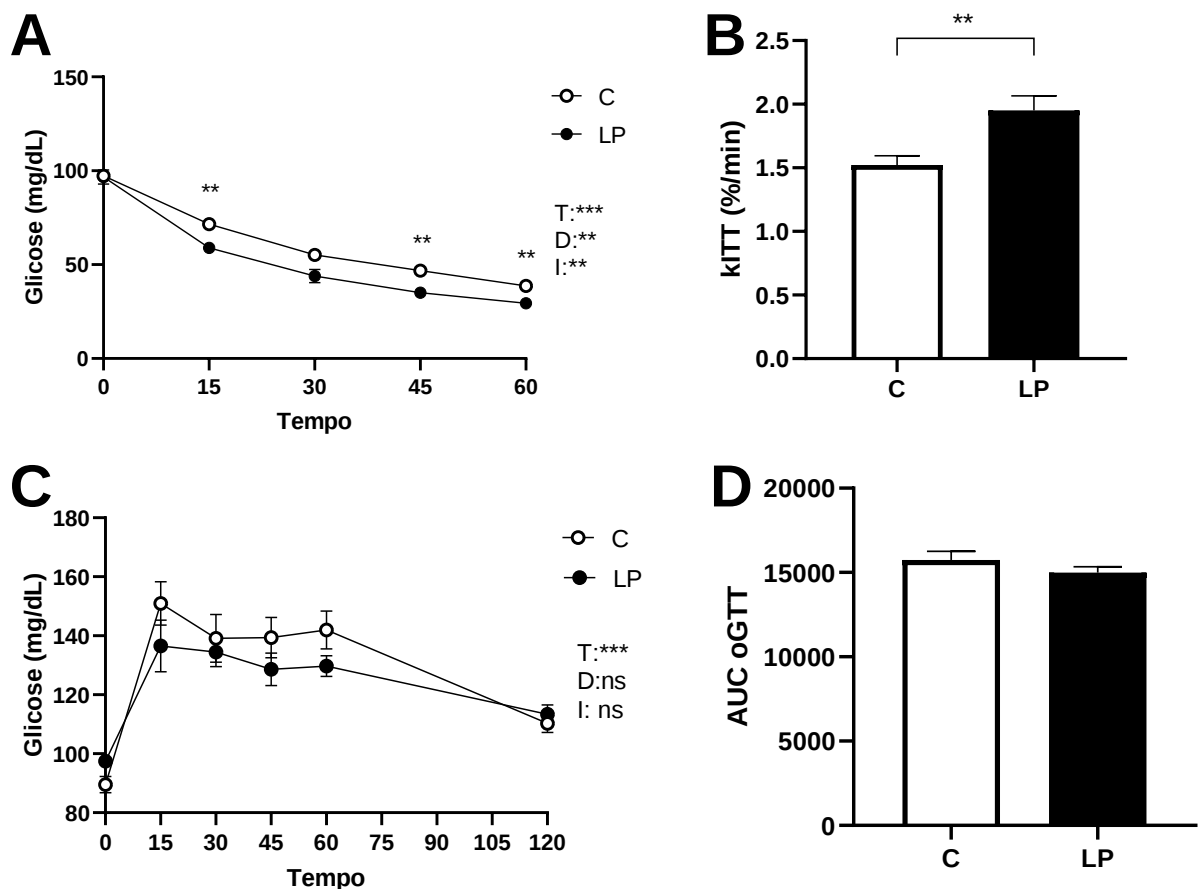


FIGURA 3: Análise de metabolismo da glicose. **A:** Curva do ipITT para os grupos controle (n=12) e LP (n=10), fator tempo (T)  $p<0.0001^{***}$ , fator dieta (D)  $p=0.003^{**}$ , e interação (I)  $p=0.007^{***}$ . **B:** kITT ( $p=0.004^{**}$ ), C:  $1,52\pm 0,07$ ; LP:  $1,95\pm 0,01$ . **C:** Curva do oGTT dos grupos: controle (n=12) e LP (n=10),

fator tempo (T)  $p < 0.0001^{***}$ , fator dieta (D)  $p = 0.36$ , e interação (I)  $p = 0.1$ . **D**: AUC oGTT ( $p = 0.25$ ), C:  $15745 \pm 506,1$ ; LP:  $14989 \pm 356,6$ .

### Pressão Arterial

O grupo LP também teve 9,66% de aumento de pressão arterial sistólica um dia após o final da lactação (Figura 4:  $p = 0.0002$ ), comparado ao grupo controle.

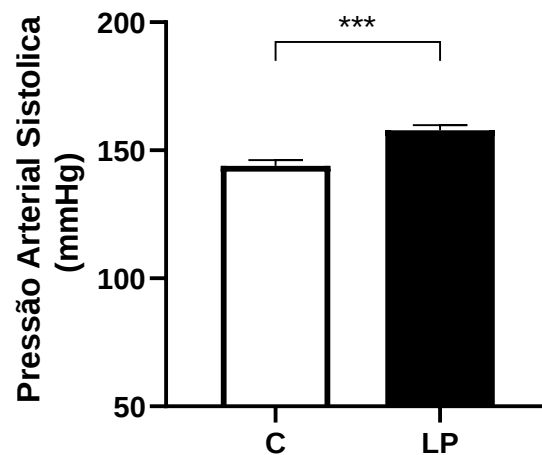


FIGURA 4: Pressão Arterial Sistólica dos grupos controle (n=11) e LP (n=10), ( $p = 0.0002^{***}$ ). C:  $143,9 \pm 2,28$ ; LP:  $157,8 \pm 2,02$ .

### Parâmetros biométricos e bioquímicos

O grupo LP apresentou uma adiposidade 15,5% menor quando comparado ao grupo controle (Tabela 2:  $p = 0,036$ ), com uma redução nas gorduras retroperitoneal (Tabela 2:  $p = 0,046$ ) e uterina (Tabela 2:  $p = 0,02$ ). Os níveis de triglicerídeos foram 19,9% menores nos animais LP do que nos C (Tabela 2:  $p = 0,02$ ). A dieta LP causou um aumento na glicemia de jejum de 8,8% quando comparado com o efeito da dieta C (Tabela 2:  $p = 0,03^*$ ).

TABELA 2: Tabela de dados biométricos e bioquímicos.

| Parâmetros biométricos e bioquímicos | C                | LP               | P valor        |
|--------------------------------------|------------------|------------------|----------------|
| Peso corporal aos 21 dias (g)        | $319,8 \pm 6,21$ | $274,7 \pm 4,38$ | $0,0001^{***}$ |
| Coração (g/100g de peso corporal)    | $0,43 \pm 0,007$ | $0,43 \pm 0,008$ | 0,8            |
| Pâncreas (g/100g de peso corporal)   | $0,51 \pm 0,02$  | $0,53 \pm 0,03$  | 0,62           |
| Fígado (g/100g de peso corporal)     | $3,45 \pm 0,06$  | $3,53 \pm 0,09$  | 0,45           |

|                                                   |              |               |        |
|---------------------------------------------------|--------------|---------------|--------|
| Ovário (g/100g de peso corporal)                  | 0,04 ± 0,002 | 0,042 ± 0,002 | 0,25   |
| Gordura mesentérica (g/100g de peso corporal)     | 0,71 ± 0,03  | 0,69 ± 0,05   | 0,66   |
| Gordura retroperitoneal (g/100g de peso corporal) | 1,04 ± 0,09  | 0,79 ± 0,06   | 0,046* |
| Gordura uterina (g/100g de peso corporal)         | 0,79 ± 0,04  | 0,67 ± 0,04   | 0,02*  |
| Gordura ovariana (g/100g de peso corporal)        | 0,74 ± 0,05  | 0,65 ± 0,05   | 0,23   |
| Adiposidade                                       | 3,29 ± 0,17  | 2,78 ± 0,15   | 0,036* |
| Glicemia de jejum (mg/dL)                         | 89,5 ± 2,76  | 97,4 ± 1,57   | 0,03*  |
| Colesterol (mg/dL)                                | 65,2 ± 2,86  | 73,1 ± 3,38   | 0,09   |
| Triglicerídeos (mg/dL)                            | 110,5 ± 7,12 | 88,5 ± 3,8    | 0,02*  |

### Peso da Ninhada

Analizando o peso dos filhotes durante a lactação, é possível observar que os animais LP apresentaram um crescimento menor que os animais controles, com diferença significativa a partir da primeira semana de lactação (Figura 5A:  $p < 0.0001$ ). As análises de área sob a curva do ganho de peso durante a intervenção dietética e na semana seguinte após o retorno da dieta controle corroboram com o resultado de que esses animais apresentaram crescimento reduzido (Figura 5B:  $p < 0.0001$ ; Figura 5C:  $p < 0.0001$ ). Ao final dos 21 dias o peso dos filhotes LP ainda era 113,4% menor que os animais controles (Figura 5A: 0,0001).

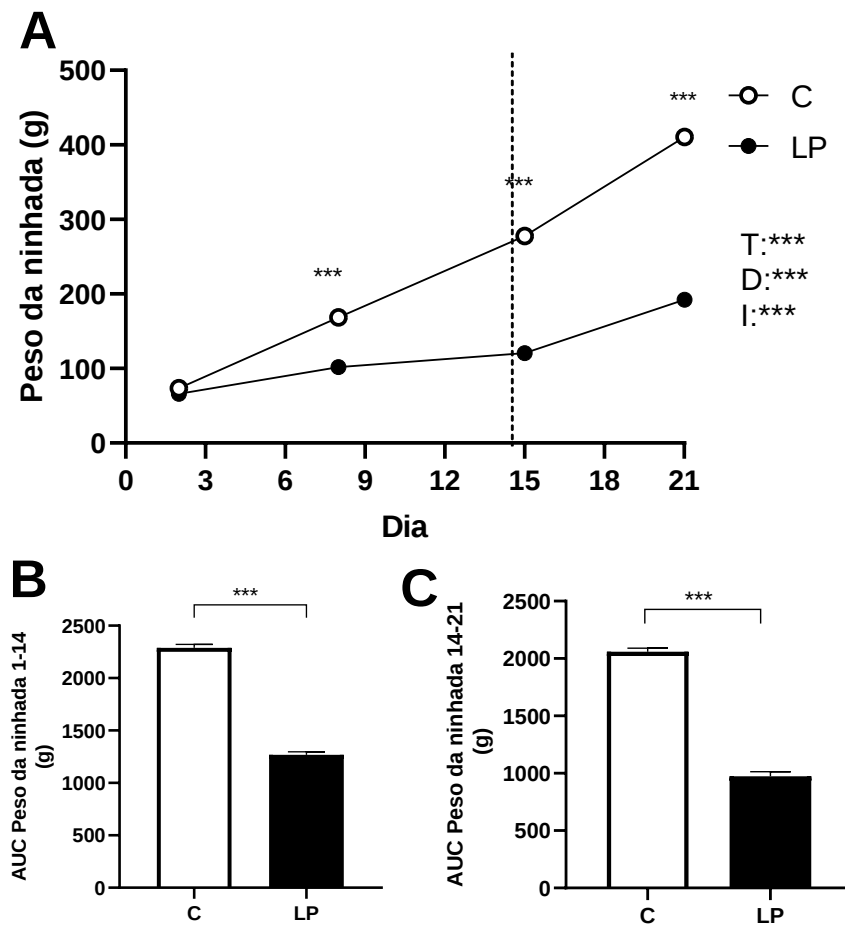


FIGURA 5: Dados de progressão de peso de ninhada dos grupos controle (n=9) e LP (n=8). Fator tempo (T)  $p<0.0001^{***}$ , fator dieta (D)  $p<0.0001^{***}$ , e interação (I)  $p<0.0001^{***}$ . **A**: gráfico de progressão de peso de ninhada ponto-a-ponto ao longo da lactação. **B**: Área sob a curva de peso de ninhada do dia 1 ao 14 ( $p<0.0001^{***}$ ), C:  $2289\pm33,8$ ; LP:  $1268\pm27,82$ . **C**: Área sob a curva de consumo do dia 14 ao 21 ( $p<0.0001^{***}$ ), C:  $2059\pm32,3$ ; LP:  $974,9\pm38,6$ .

### Análise Metabolômica do leite

A partir da matriz completa com todos os *features* foi gerado um dendrograma de hierarquia (Figura 6). A análise de agrupamento hierárquico revelou uma separação clara das amostras de leite materno já no primeiro nível hierárquico do dendrograma. Observou-se a formação de dois *clusters* principais, correspondentes aos grupos LP e C, indicando que a dieta materna constituiu o principal fator de diferenciação no perfil metabolômico do leite. Embora a segregação entre os grupos LP e C tenha ocorrido já no primeiro nível hierárquico do dendrograma, níveis hierárquicos subsequentes revelaram padrões de organização intragrupo, dessa maneira foi possível identificar padrões de agrupamento intragrupo relacionados ao

tempo de lactação. Especificamente no dia 21, quatro das seis amostras de cada grupo experimental mostraram uma tendência a se agruparem com poucos níveis hierárquicos de separação enquanto as demais permaneceram mais distantes, indicando que a dispersão no perfil metabolômico do leite é reduzida no último dia de lactação em ambos os grupos.

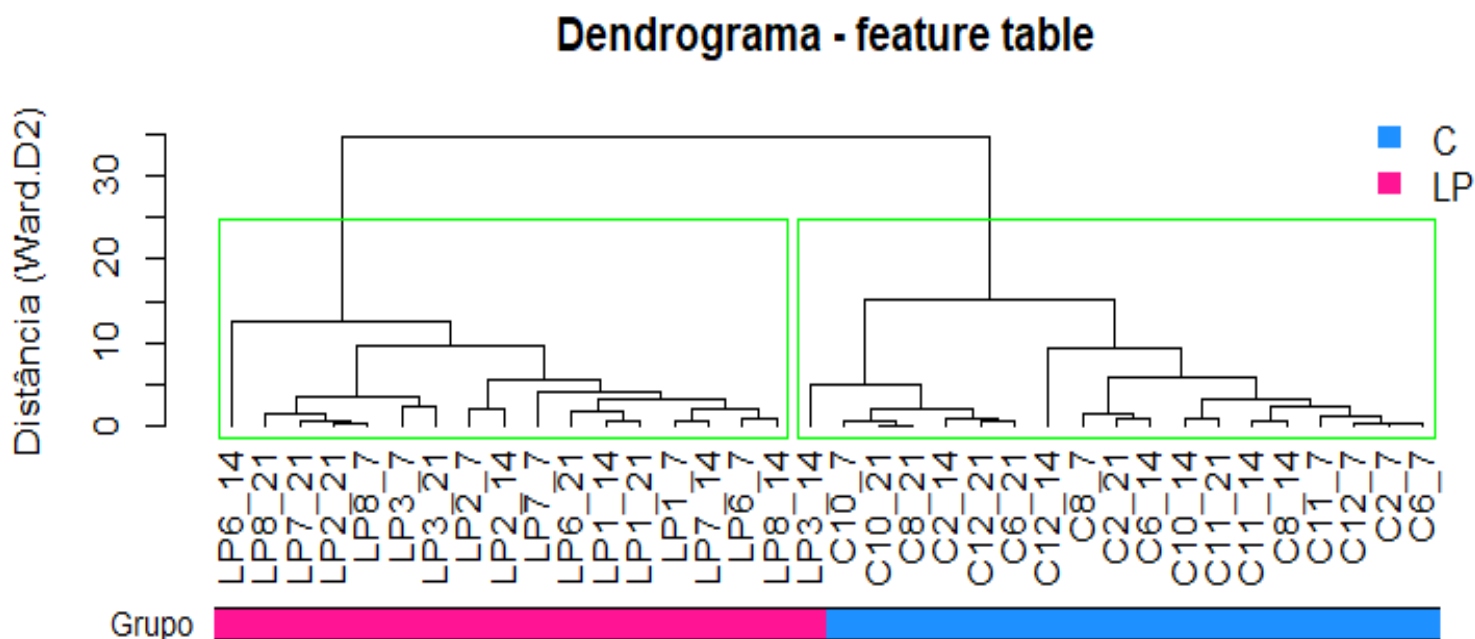


FIGURA 6: Dendrograma de agrupamento hierárquico das amostras de leite de ratas dos grupos C e LP, coletadas nos dias 7, 14 e 21 de lactação, construído com base na matriz de todos os features detectados no modo positivo de ionização. Os dados foram submetidos à normalização, e a análise de agrupamento foi realizada no RStudio.

Os dados de análise de componentes principais (PCA) (Figura 7) utilizando os 25 principais componentes do leite nos 3 tempos de coleta corroboram com o resultado do dendrograma (Figura 6). A distribuição das amostras no gráfico de scores (Figura 7 A) revela uma separação clara entre o leite de ratas alimentadas com diferentes dietas durante a lactação. É possível observar que os animais do grupo LP e C se distanciam no primeiro componente principal (PC1) mostrando que esses grupos apresentam composições químicas diferentes. Os animais LP se distanciaram negativamente em PC1, e os animais C positivamente, com PC1 explicando 34,5% da variância total dos dados e PC2 17,2%, totalizando 51,7% da variância explicada pelos dois primeiros eixos (Figura 7 A).

Ainda na Figura 7 A, o gráfico de *Loadings* que se encontra sobreposto ao PCA mostra que os  $m/z$  531.33707, 575.36326, 327.20044 e 272.25877 são os íons com maior correlação negativa com PC1 e apesar desses compostos não terem sido

anotados, pode-se afirmar que se encontram em maior abundância nas amostras do grupo LP que estão situadas negativamente em PC1. Enquanto isso os  $m/z$  454.86862, 452.87133, que também não foram anotados, são os íons com maior correlação positiva com PC1, e por conta disso se encontram em maior abundância nas amostras do grupo C que estão situadas positivamente em PC1. Em PC2 observa-se que os *Loadings* que diferenciam as amostras apresentam principalmente projeção negativa. Vale ressaltar que esses compostos não foram anotados, ou por serem compostos desconhecidos, ou não por não existirem nos bancos de dados utilizados.

Apesar de PC2 não apresentar uma separação clara, é possível observar no gráfico de *Loadings* sobreposto ao PCA (Figura 7 A) que as amostras do dia 21 em ambos os grupos apresentam uma tendência a se concentrarem situadas positivamente em PC2, enquanto as amostras dos dias 7 e 14 se encontram mais dispersas. Isso indica que as amostras do dia 21 são mais semelhantes entre si do que as amostras dos outros dias, quando considerado PC2.

Na Figura 7B foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) utilizando os 25 principais componentes do leite coletado no 7º dia de lactação, com PC1 explicando 47,7% da variância total dos dados e PC2 17%, totalizando 64,7% da variância explicada pelos dois primeiros eixos. É possível ver que no dia 7 a distribuição das amostras no gráfico de *scores* ainda mantém uma diferenciação clara entre o grupo L e o C em PC1, com os animais LP se distanciando positivamente, e os animais C negativamente. Em PC2 é possível observar que os animais do grupo LP apresentam uma maior dispersão no gráfico de PCA do que os animais do grupo C, indicando que a dieta LP causou uma maior variação nos metabólitos do leite no dia 7 da lactação quando comparado com a dieta padrão no mesmo dia.

Nas análises de PCA das amostras dos tempos 14 (Figura 7 C) e 21 (Figura 7 D), os grupos LP e C se mantiveram com distinção clara entre os grupos em PC1. A Figura 7C apresenta uma análise de componentes principais (PCA) realizada utilizando os 25 principais componentes das amostras de leite coletadas no 14º dia de lactação, mostrando que os dois primeiros componentes principais explicam juntos 69,1% da variância total dos dados (PC1 = 40,1%; PC2 = 29%). Na Figura 7D foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) utilizando os 25 principais componentes do leite coletado no 7º dia de lactação, com PC1 explicando 37,8% da variância total dos dados e PC2 21,3%, totalizando 59,1% da variância explicada pelos dois primeiros eixos.

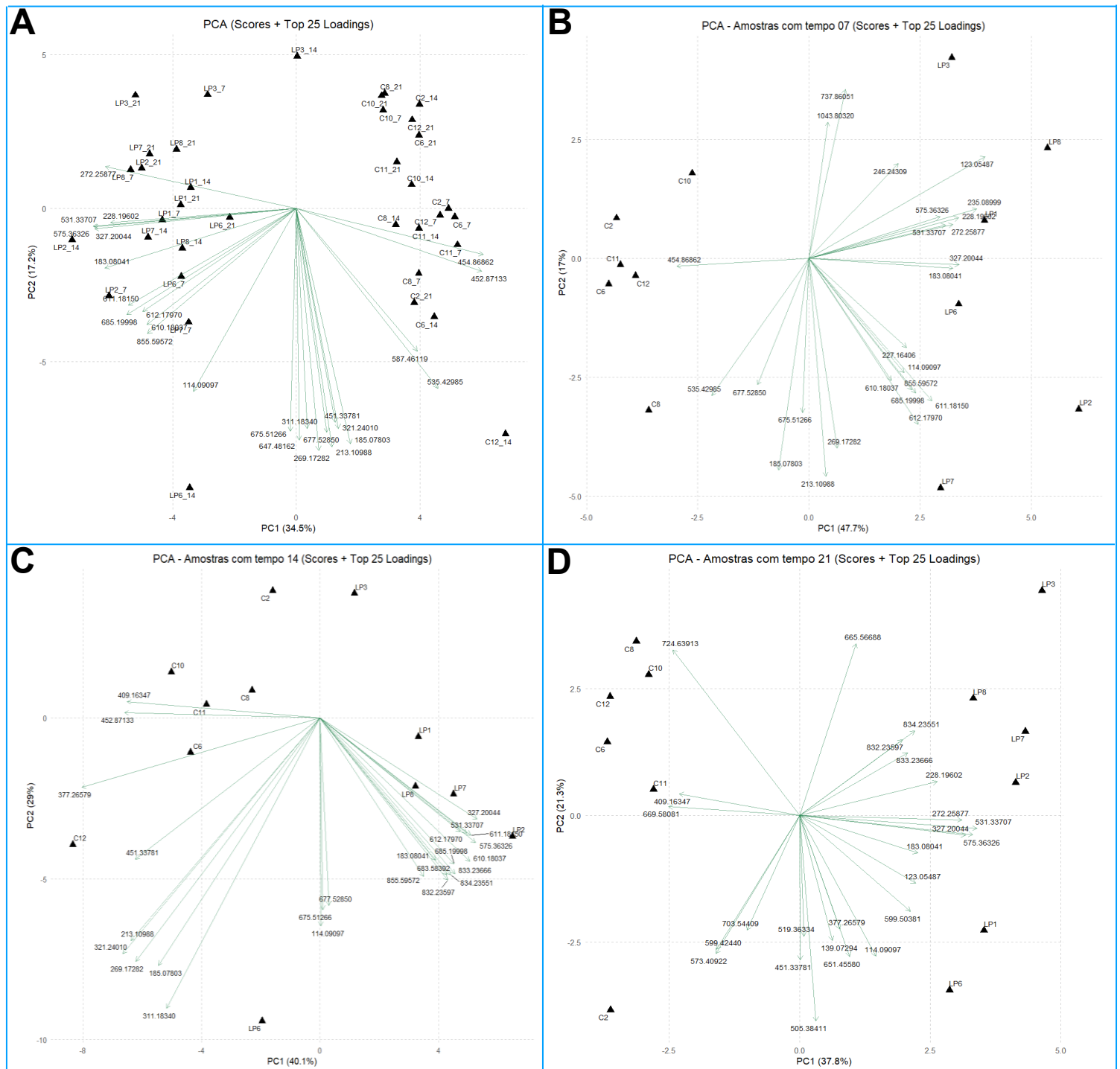


FIGURA 7: Análise de Componentes Principais (PCA) dos dados obtidos a partir da extração do leite com acetato de etila analisado no modo positivo de ionização utilizando UHPLC-MS/MS, sobreposto ao seu gráfico de *Loadings*, utilizando os 25 principais componentes. **A:** PCA com *Loadings* sobreposto dos animais C e LP em todos os tempos de coleta de leite (dia 7, 14 e 21). **B:** PCA com *Loadings* sobreposto dos animais C e LP da coleta do dia 7. **C:** PCA com *Loadings* sobreposto dos animais C e LP da coleta do dia 14. **D:** PCA com *Loadings* sobreposto dos animais C e LP da coleta do dia 21.

Foi realizada também uma análise de *K-means*, utilizando a matriz completa de todos os *features* (Figura 8). O número ótimo de *clusters* ( $k = 2$ ) foi definido com base no método do cotovelo (APÊNDICE A). Na Figura 8 A foi realizada uma análise de *K-*

*means* com as amostras de leite dos grupos C e LP em todos os tempos de coleta, sendo esses os dias 7, 14 e 21 da lactação. O *cluster* 1 concentrou majoritariamente amostras do grupo LP, enquanto o *cluster* 2 foi composto predominantemente por amostras do grupo C indicando que a dieta materna está fortemente associada à organização dos perfis metabolômicos do leite (Figura 8 A). É possível observar que nas Figuras 8 A, B e D não houve basicamente nenhuma intersecção e sobreposição entre os *clusters*, sugerindo diferença significativa entre os grupos. Nas amostras do dia 14 (Figura 8 C) houve uma leve sobreposição dos *clusters* porém a análise de *K-means* ainda foi capaz de fazer uma separação visual clara entre os *clusters*, indicando que há diferença significativa entre os grupos.

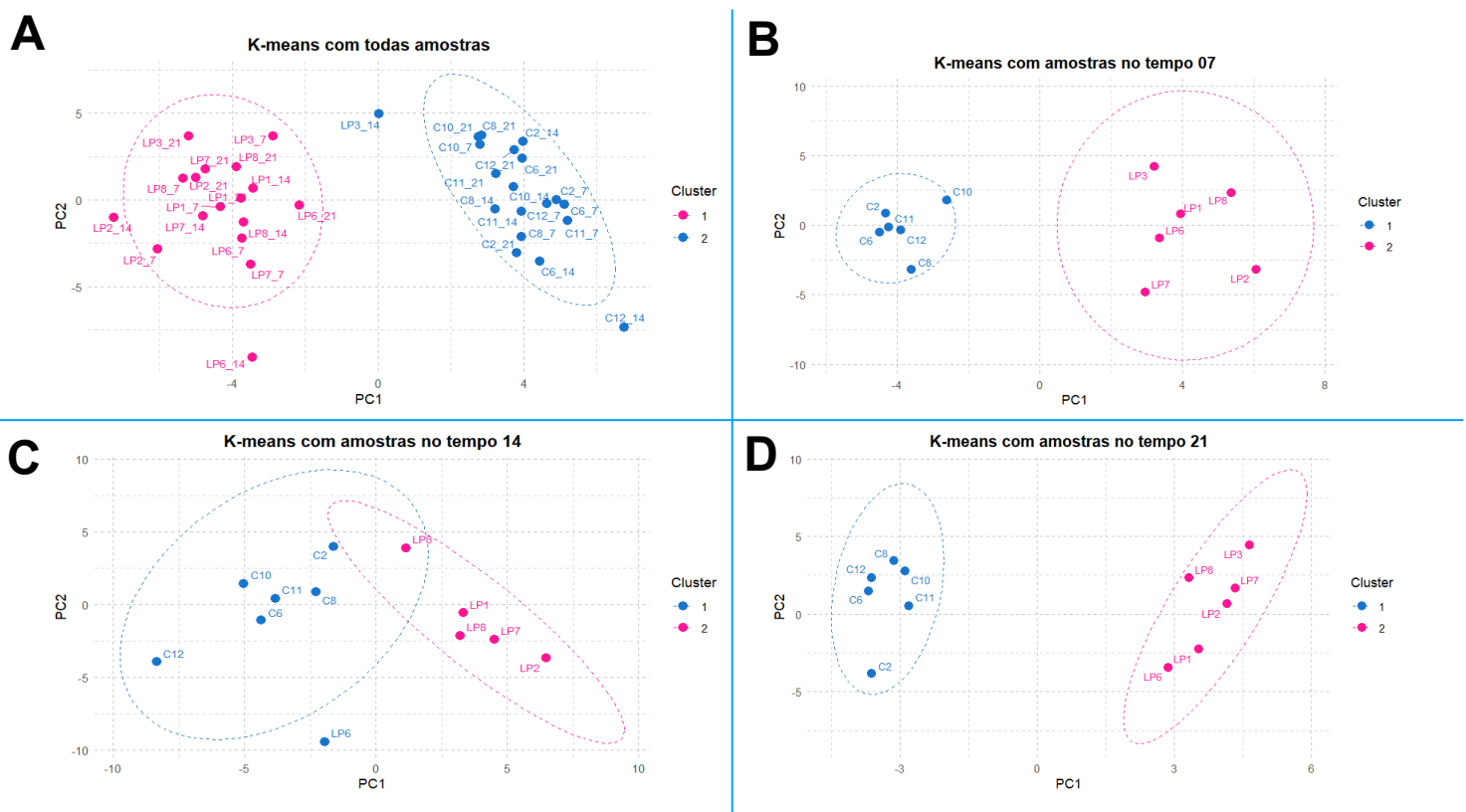


FIGURA 8: Análise de Componentes Principais (PCA) aliado ao agrupamento *k-means* dos dados obtidos a partir da extração do leite com acetato de etila analisado no modo positivo de ionização utilizando UHPLC-MS/MS, utilizando a matriz com todos os componentes. **A:** PCA aliado ao agrupamento *k-means* dos animais C e LP em todos os tempos de coleta de leite (dia 7, 14 e 21). **B:** PCA aliado ao agrupamento *k-means* dos animais C e LP da coleta do dia 7. **C:** PCA aliado ao agrupamento *k-means* dos animais C e LP da coleta do dia 14. **D:** PCA aliado ao agrupamento *k-means* dos animais C e LP da coleta do dia 21.

Os resultados do *k-means* são consistentes com a análise hierárquica, reforçando que a condição nutricional materna representa o principal fator associado à segregação dos perfis metabolômicos do leite.

A anotação de compostos conhecidos foi realizada utilizando o *software Metaboescape* (Tabela 3), dos quais foram então selecionados aqueles de interesse biológico para a análise de *Heatmap* com hierarquia utilizando das intensidades de sinal das amostras (Figura 9). O heatmap mostra a diferença dos metabólitos dos leites de ratas alimentadas com dieta LP ou C durante a lactação. O eixo horizontal representa as amostras e sua hierarquia, enquanto o eixo vertical representa as variáveis que neste caso são os compostos anotados de interesse. Os retângulos vermelhos indicam a intensidade de sinal das amostras para aqueles compostos. Quanto mais escuro o tom do vermelho, maior a intensidade detectada, indicando maior abundância relativa daquele composto nas amostras.

TABELA 3. Anotação de metabólitos do leite das ratas C e LP, obtida por análises de UHPLC-HRMS/MS em modo positivo.

| Metabólito                        | Fórmula molecular                                                        | Massa exata <i>m/z</i> | Íon precursor <i>m/z</i> | Erro (ppm) | <i>t<sub>R</sub></i> (min) |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|------------|----------------------------|
| <i>Esteroides</i>                 |                                                                          |                        |                          |            |                            |
| <i>Progesterona</i>               | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub><br>[M+H] <sup>+</sup>     | 315,2318               | 315,2324                 | -1,90      | 18,73                      |
| <i>Dihidroprogesterona</i>        | C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub><br>[M+H] <sup>+</sup>     | 317,2475               | 317,2444                 | 9,66       | 23,35                      |
| <i>Estradiol</i>                  | C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub><br>[M+H] <sup>+</sup>     | 273,1849               | 273,1826                 | 8,41       | 19,69                      |
| <i>Colesterol</i>                 | C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O<br>[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> | 369,3515               | 369,3498                 | 4,60       | 26,83                      |
| <i>7-hidroxi-4-colesten-3-ona</i> | C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub><br>[M+H] <sup>+</sup>     | 401,3414               | 401,3398                 | 3,98       | 23,30                      |
| <i>Vitaminas</i>                  |                                                                          |                        |                          |            |                            |
| <i>Nicotinamida</i>               | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O<br>[M+H] <sup>+</sup>     | 123,0552               | 123,0551                 | 0,81       | 1,42                       |
| <i>Lipídeos</i>                   |                                                                          |                        |                          |            |                            |
| <i>LPC 18:2</i>                   | C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P<br>[M+H] <sup>+</sup>  | 520,3397               | 520,3386                 | 2,11       | 20,78                      |
| <i>LPE 18:0</i>                   | C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P<br>[M+H] <sup>+</sup>  | 482,3241               | 482,3214                 | 5,59       | 22,26                      |
| <i>LPE 18:2</i>                   | C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P<br>[M+H] <sup>+</sup>  | 478,2928               | 478,2912                 | 3,34       | 20,81                      |
| <i>SM 18:1;O<sub>2</sub>/16:0</i> | C <sub>39</sub> H <sub>79</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P          | 703,5748               | 703,5691                 | 8,10       | 25,59                      |

|                                      |                                                   |          |          |      |       |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------|----------|----------|------|-------|
|                                      | [M+H] <sup>+</sup>                                |          |          |      |       |
| DG(10:0/18:1)                        | C <sub>31</sub> H <sub>58</sub> O <sub>5</sub>    | 528,4622 | 528,4603 | 3,59 | 25,61 |
|                                      | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>                 |          |          |      |       |
| DG(10:0/18:2)                        | C <sub>31</sub> H <sub>56</sub> O <sub>5</sub>    | 526,4466 | 526,4447 | 3,60 | 24,85 |
|                                      | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>                 |          |          |      |       |
| DG(14:0/18:2)                        | C <sub>35</sub> H <sub>64</sub> O <sub>5</sub>    | 582,5092 | 582,5080 | 2,06 | 27,67 |
|                                      | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>                 |          |          |      |       |
| DG(16:0/18:2)                        | C <sub>37</sub> H <sub>68</sub> O <sub>5</sub>    | 610,5405 | 610,5376 | 4,79 | 24,51 |
|                                      | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>                 |          |          |      |       |
| DG(18:2/18:2)                        | C <sub>39</sub> H <sub>68</sub> O <sub>5</sub>    | 634,5405 | 634,5385 | 3,15 | 23,03 |
|                                      | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>                 |          |          |      |       |
| TG(10:0/18:1/18:2)                   | C <sub>49</sub> H <sub>88</sub> O <sub>6</sub>    | 795,6473 | 795,6425 | 6,03 | 23,69 |
|                                      | [M+Na] <sup>+</sup>                               |          |          |      |       |
| Fosfatidiletanolamina<br>(20:1/16:1) | C <sub>41</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P | 744,5537 | 744,5513 | 3,22 | 22,00 |
|                                      | [M+H] <sup>+</sup>                                |          |          |      |       |
| PC(34:2)                             | C <sub>42</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P | 758,5694 | 758,5666 | 3,69 | 26,37 |
|                                      | [M+H] <sup>+</sup>                                |          |          |      |       |
| PC(38:4)                             | C <sub>46</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P | 810,6007 | 810,5988 | 2,34 | 28,11 |
|                                      | [M+H] <sup>+</sup>                                |          |          |      |       |
| <i>Nucleosídeos e nucleobases</i>    |                                                   |          |          |      |       |
| 9-Metilguanina                       | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub> O    | 166,0723 | 166,0714 | 5,41 | 1,08  |
|                                      | [M+H] <sup>+</sup>                                |          |          |      |       |
| <i>Outros</i>                        |                                                   |          |          |      |       |
| Xilazina                             | C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> S  | 221,1106 | 211,1105 | 0,45 | 8,76  |
|                                      | [M+H] <sup>+</sup>                                |          |          |      |       |
| Ketoprofeno                          | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>    | 255,1015 | 255,1001 | 5,48 | 17,00 |
|                                      | [M+H] <sup>+</sup>                                |          |          |      |       |
| Ketamina                             | C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> ClNO              | 238,0993 | 238,0990 | 1,25 | 8,64  |
|                                      | [M+H] <sup>+</sup>                                |          |          |      |       |
| Norketamina                          | C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> ClNO              | 224,0836 | 224,0835 | 0,44 | 8,71  |
|                                      | [M+H] <sup>+</sup>                                |          |          |      |       |

No geral, a hierarquia do *Heatmap* utilizando os 10 compostos de interesse biológico manteve a separação dos grupos LP e C, mostrando que mesmo para essas poucas moléculas o fator da dieta ainda diferencia os grupos. Observou-se que as amostras do grupo LP apresentaram predominantemente maior abundância relativa de um conjunto específico de metabólitos. O *Heatmap* evidenciou um claro aumento na progesterona, nicotinamida, Lisofosfatidiletanolamina 18:0 (LPE 18:0) e

Esfingomiéline 18:1;O2/16:0 (SM 18:1;O2/16:0) no leite dos ratos LP principalmente nos dias 7 e 14 de coleta. Por outro lado, o leite dos animais LP apresentou uma redução clara nos níveis de 17-beta-Estradiol nos dias 7 e 14. Para o colesterol o heatmap não evidenciou um padrão visual claramente distinto de abundância relativa entre os grupos LP e C, sendo possível observar a presença de intensidades elevadas e reduzidas de metabólitos distribuídas em ambos os grupos experimentais

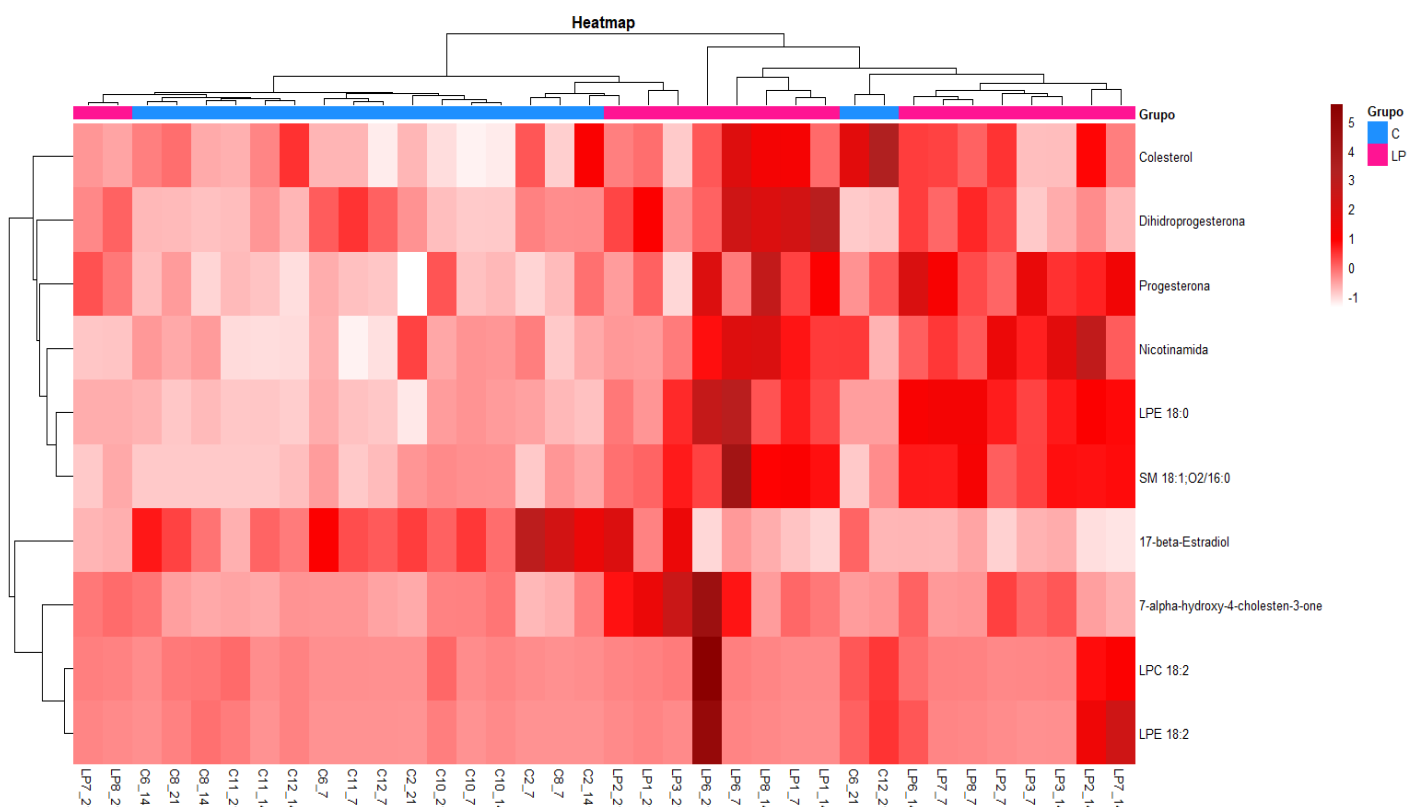


FIGURA 9. Mapa de calor (*heatmap*) com hierarquia representando as intensidades relativas dos íons referentes a moléculas de interesse detectados entre as amostras analisadas, evidenciando diferenças nos perfis de intensidade entre amostras de leite dos ratos C e LP em todos os tempos de coleta.

## 5 DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou os efeitos da restrição proteico-calórica durante a lactação sobre o perfil metabólico do leite. Para tal foi realizada uma análise metabólica exploratória, onde se viu uma separação clara no perfil químico do leite de ratas alimentadas com dieta LP quando comparadas com dieta C, evidenciando que a dieta LP influencia diretamente na qualidade do leite. O principal achado deste trabalho no leite são os metabólitos de interesse biológico que foram anotados e se apresentaram em diferentes concentrações no grupo LP, com aumento na

progesterona, nicotinamida, LPE 18:0 e SM 18:1;O2/16:0 nos dias 7 e 14, e redução de 17-beta-Estradiol durante o mesmo período. O presente estudo também investigou as repercussões de uma dieta com restrição proteico-calórica, durante o período de lactação, na função cardiometabólica de ratas Wistar. Os principais achados nesses animais foram a maior sensibilidade à insulina e a elevação da pressão arterial sistólica (PAS) e níveis de triglicerídeos mais baixos nas ratas LP.

Os parâmetros biométricos demonstraram que as ratas do grupo LP tiveram um peso corporal menor e uma menor adiposidade ao final do experimento, corroborando com estudos em fêmeas lactantes (MARTINS *et al.*, 2023). Essa acentuada perda de peso corporal está relacionada à importante restrição proteico-calórica observada neste modelo. Mesmo diante de uma dieta isocalórica, os animais apresentam uma reduzida ingesta levando também a restrição calórica, como já visto na literatura (MARTINS *et al.*, 2023).

A análise do metabolismo da glicose, através do oGTT e ipITT, apontam para um aumento na sensibilidade à insulina nas ratas lactantes expostas a restrição proteico-calórica da dieta LP. Este perfil pode ser uma estratégia de adaptação metabólica para viabilizar o aporte de glicose para os tecidos diante da restrição nutricional (WANG *et al.*, 2020). No presente estudo não foi avaliado os níveis de insulina desses animais, porém outros trabalhos apontam que a insulinemia se encontra reduzida em ratas lactantes expostas a uma dieta pobre em proteína (MORETTO *et al.*, 2010; BAUTISTA *et al.*, 2019). Neste estudo mostramos que as ratas expostas a restrição proteico-calórica apresentam uma glicemia aumentada, o que já foi previamente observado em outros estudos (MARTINS *et al.*, 2023; BAUTISTA *et al.*, 2019). Martins e colegas (2023) especulam que o aumento na glicemia é uma adaptação para garantir o suprimento energético para o leite e desenvolvimento da prole (MARTINS *et al.*, 2023). As ratas apresentaram também uma maior sensibilidade à insulina após a lactação, o que estaria corroborando com a literatura tanto em dieta de restrição proteica (KANG; LEE; BAIK, 2011) quanto calórica (SHARMA, 2012). Kang e colaboradores, 2011, sugerem que o aumento da sensibilidade a insulina pode estar relacionado ao aumento da adiponectinemia, que além do seu papel sobre o metabolismo de lipídeos, também afeta a sensibilidade a insulina (KANG; LEE; BAIK, 2011). Palou e colaboradores (2019) encontraram aumento de adiponectina no leite de ratas em modelo de restrição calórica, reforçando essa hipótese (PALOU *et al.*, 2019). No presente estudo não foi avaliada a

adiponectinemia e mais estudos precisam ser realizados para avaliar o seu papel no metabolismo da glicose, no presente modelo.

As ratas LP apresentaram níveis reduzidos de triglicerídeos plasmáticos. Resultados similares foram observados previamente em machos (TREVIÑO-VILLARREAL *et al*, 2018). Os triglicerídeos circulantes são empacotados com apoproteínas no fígado e transportados para os tecidos na forma de VLDL. O metabolismo dos triglicerídeos não foi avaliado profundamente no presente estudo, mas a redução de triglicerídeos no presente modelo poderia estar relacionado a disfunção na função transportadora da VLDL, como observado em outros modelos de restrição proteico-calórica. Treviño e colaboradores (2018) apontam uma diminuição na secreção e consumo circulante de VLDL em animais com restrição proteica (7%–9% de proteína) por 7 dias, em partes devido atividade da via da CREBH-APOA5 ativando lipase lipoproteica e consequente diminuição de VLDL circulante (TREVIÑO-VILLARREAL *et al*, 2018). Outro estudo apontou que a diminuição da secreção de VLDL pelo fígado em animais, após 28 dias de exposição à dieta contendo apenas 8% de proteína, está associada a uma redução na expressão da proteína de transferência de triglicerídeos microssomal (MTP), importante na montagem e secreção de VLDL (KANG; LEE; BAIK, 2011).

Um dos resultados mais significativos foi o aumento da pressão arterial sistólica (PAS) nas fêmeas lactantes LP. Este aumento da pressão arterial poderia ser um mecanismo compensatório visando melhorar o baixo aporte calórico e proteica para os tecidos, diante da presente restrição proteico-calórica. Este quadro de hipertensão corrobora com outros modelos de restrição proteica mais prolongada (35 dias), contudo menos severa (6% de proteína), em machos (PENITENTE *et al*., 2007). A partir de vários estudos os autores sugerem que esta hipertensão relacionada à restrição proteica pode ser dependente de uma hiperatividade simpática (TROPIA *et al*., 2001). Este mecanismo poderia estar relacionado ao presente modelo, contudo mais estudos precisam ser realizados para esclarecer este mecanismo.

Neste estudo os filhotes das ratas alimentadas com dieta LP apresentam crescimento reduzido ao longo da lactação e menor tamanho no dia de desmame. Esse dado é consistente com achados prévios (MARTINS *et al*., 2023). Conforme Moretto e colegas (2010), animais alimentados com dieta pobre em proteína apresentam redução na produção de leite diária, sugerindo uma redução na ingesta de leite pelos filhotes (MORETTO *et al*, 2010), causando crescimento reduzido. Os

autores discutem que essa redução na produção de leite acontece por conta de um desenvolvimento menor das glândulas mamárias e secreção de prolactina, que são comprometidos pela dieta LP (MORETTO *et al*, 2010).

A análise metabolômica revelou diferença significativa no perfil do leite dos animais LP comparado com os animais C. Esse padrão foi observado por diferentes abordagens analíticas, incluindo análise de agrupamento hierárquico, PCA e *K-means* independente do dia de coleta. Palou e colegas (2019) investigaram o leite de ratas Wistar sob restrição calórica e também evidenciaram separação clara entre os leites sob diferentes dietas por análise de PCA (PALOU *et al*, 2019). Outro estudo, com restrição proteica durante a gestação em conjunto com a lactação também corrobora com esse achado (AGNOUX *et al*, 2015) indicando que a alimentação durante a lactação influencia diretamente no perfil metabolômico do leite, e que a metabolômica é um método válido para diferencia-los.

Os resultados de PCA, *K-means* e hierarquia indicaram que, embora os grupos tenham permanecido claramente separados ao longo da PC1, observou-se uma aproximação parcial das amostras ao longo da PC2 no dia 21 de lactação (Figura 7A). Considerando a influência que a dieta apresenta sobre o perfil metabolômico do leite (AGNOUX *et al*, 2015; PALOU *et al*, 2019) uma possível explicação para esse resultado é o retorno da dieta C para os animais LP após o dia 14. Isso indicaria que embora o histórico nutricional exerça um efeito duradouro sobre a metabolômica do leite, o retorno da dieta C pode modular componentes metabólicos secundários, refletidos em fontes de variância menos dominantes. Contudo, mais estudos são necessários para elucidar esse resultado.

O *heatmap* indica que o leite de ratas alimentadas com a dieta LP apresenta aumento nos níveis de progesterona nos dias de coleta 7 e 14. Martins e colaboradores (2023) já demonstraram que a mesma dieta LP utilizada nesse trabalho causa aumento de corticosterona no plasma e leite materno aos 14 dias de lactação levantando a hipótese que o aumento da progesterona aconteça por conta do aumento da ativação da via de produção da corticosterona (MARTINS *et al*, 2023). Jáé reportado aumento de glicocorticóides como a corticosterona em animais sob restrição calórica, o que indica ativação do eixo HPA (TOMIYAMA *et al*, 2010; MARTINS *et al*, 2023). Estudos em humanos e animais revelam aumento de progesterona no sangue em resposta ao estresse que corrobora com essa hipótese (WIRTH *et al*, 2007).

Os resultados da análise metabolômica também revelaram redução de 17- $\beta$ -estradiol no leite de animais do grupo LP. Já foi demonstrado que estresse reduz a secreção de hormônios estrógenos (TOUFEXIS *et al*, 2014). Joseph e colaboradores (2017) afirmam que isso acontece por conta da ação do estresse que induz o eixo HPA estimulando a produção de cortisol/corticosterona que por sua vez inibe o eixo HPG (JOSEPH *et al*, 2017). O eixo HPG media a produção de hormônios esteroides pela secreção do hormônio-liberador-das-gonadotrofinas (GnRH), que por sua vez estimula as células gonadotróficas que secretam hormônios-folículo-estimulante (FSH) e hormônio-lutenizante (LH). Esses hormônios atuam nos ovários, causando a secreção de hormônios esteroides como o estradiol. Os hormônios glicocorticóides, como a corticosterona, causam inibição dos neurônios secretores do GnRH, das células gonadotróficas e das próprias gônadas, causando então a redução do estradiol (JOSEPH *et al*, 2017; WHIRLEDGE *et al*, 2017; MAGIAKOU *et al*, 1997).

Os resultados do *heatmap* da metabolômica revelam que o leite de ratas alimentadas com dieta LP apresenta um aumento nos níveis de LPE 18:0, um lipídeo da classe dos lisoglicerofosfolipídeos (HISHIKAWA *et al*, 2014). O aumento na concentração de LPE foi encontrado no leite de mulheres que passaram por cirurgia de cesárea quando comparado com mulheres que tiveram parto natural (YU *et al*, 2023). Os autores desse estudo especulam que esse aumento em LPE ocorre por respostas inflamatórias pós-operatórias (YU *et al*, 2023), o que pode indicar a presença de processos inflamatórios nas ratas alimentadas com a dieta LP. Ling e colaboradores (2004) já demonstraram que a restrição proteica severa é capaz de induzir inflamação sistêmica de baixo grau, aumentando os níveis de TNF, IL-1, IL-6 e AG no plasma, o que corrobora com essa hipótese (LING *et al*, 2004). Yu e colegas (2023) acreditam que o aumento do LPE acontece por conta do aumento de diglicerídeos, como o DAG (diacilglicerol) por meio da inflamação (YU *et al*, 2023). Na rota de Kennedy, um aumento na DAG levaria a um aumento de fosfoetanolamina (PE) (GIBELLINI; SMITH, 2010), que é precursor da LPE (Figura 10). SM 18:1;O2/16:0 também foi encontrado em maiores quantidades no leite das ratas LP, apresentando uma segunda potencial via para o aumento de LPE. Maiores quantidades de SM também foram constatadas no estudo de Yu e colegas (2023).

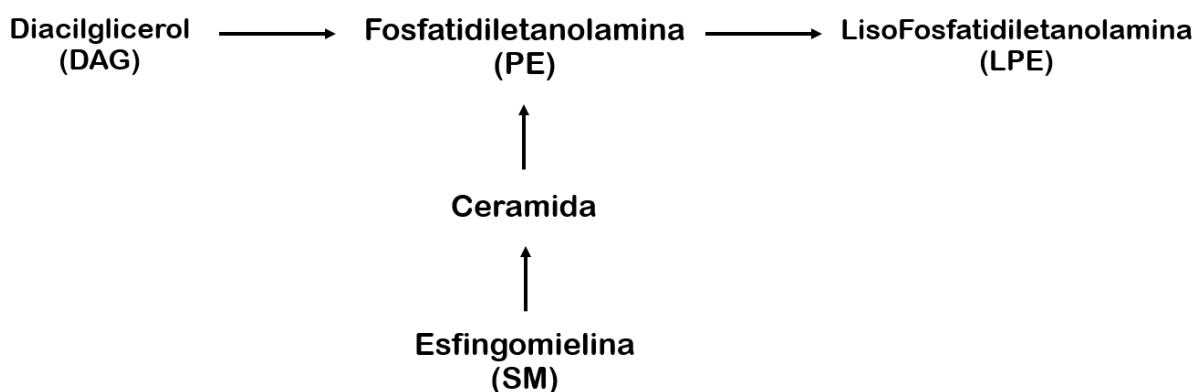


Figura 10: Imagem simplificada das vias para a síntese de LPE adaptada de YU *et al*, 2023.

Estudos revelam que os LPE apresentam funções biológicas (SHU *et al*, 2020; TSUKAHARA *et al*, 2021). O LPE 18:0 apresentou efeito estimulante em neurônios corticais *in vitro* (HISANO *et al*, 2021), entretanto alguns estudos também indicam efeitos patofisiológicos dos lipídeos da classe dos LPE. Espécies de LPE foram encontradas aumentadas no cérebro em casos de Alzheimer, Lesão Cerebral Traumática, e AVC em animais (VILLAMIL-ORTIZ *et al*, 2016; GUO *et al*, 2017; SABOGAL-GUÁQUETA *et al*, 2018). Yamamoto e colegas (2022) evidenciaram ainda que especificamente LPE 18:2 favorece o acúmulo de gordura no fígado (YAMAMOTO *et al*, 2022). Hisano e colegas (2021) discutem, que os papéis dos LPE no corpo são amplos, dependentes da célula em que atuam e na espécie de LPE, sendo ainda pouco elucidados (HISANO *et al*, 2021). Dado as atuais complexas evidências a respeito da influência biológica dos LPE é difícil inferir como o LPE 18:0 seria capaz de afetar a saúde da lactante assim como a saúde dos filhotes. Ainda são necessários estudos adicionais para elucidar plenamente os efeitos biológicos do LPE 18:0, porém é importante salientar que apresenta potencial capacidade para programação metabólica, dado as evidências de seu efeito em células do sistema nervoso central (HISANO *et al*, 2021).

No presente estudo também foi encontrado um aumento de SM 18:1;O2/16:0 nos dias 7 e 14. A classe das esfingomielinas apresenta papel fundamental na promoção do desenvolvimento do sistema nervoso, regulação da microbiota intestinal, e suporte da estrutura da membrana (YUAN *et al*, 2024). Collet e colaboradores (2017) mostraram que os níveis de SM se encontram aumentados no plasma durante restrição calórica em humanos, sendo revertido com reintrodução de dieta

normocalórica (COLLET *et al*, 2017). Os autores especulam que isso pode ser reflexo da mobilização de ácidos graxos para propósitos energéticos (COLLET *et al*, 2017). YUAN e colaboradores (2024) especulam no seu trabalho, que os lipídeos para a síntese de SM pelas glândulas mamárias se originam parcialmente do próprio tecido adiposo materno (YUAN *et al*, 2024). Portanto é possível que o aumento da mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo materno pela dieta LP seja a causa do aumento de SM no leite.

O leite de ratas submetidas a dieta de restrição proteico-calórica apresentou maiores níveis de Nicotinamida nos dias 14 e 21. Ainda não existem estudos publicados especificamente mostrando aumento de nicotinamida em leite em resposta a dietas hipoproteicas ou hipocalóricas em modelos animais. Em estudos de restrição calórica em não-lactantes, já foi demonstrado o oposto, com redução na nicotinamida plasmática, possivelmente através do aumento da expressão do gene da NAMPT (nicotinamida fosforibosiltransferase) para a produção de NAD<sup>+</sup> (POLJSK; MILISAV, 2016). A NAMPT é uma enzima que converte nicotinamida em nicotinamida mononucleotídeo, que então é convertida em NAD<sup>+</sup>, causando a redução da nicotinamida plasmática (POLJSK.; MILISAV, 2016). Apesar disso, estudos revelam que o aumento da ingestão dietética de nicotinamida eleva seus níveis no leite (HUANG, 2025) e sangue (CERVANTES; SMITH; YOUNG, 1996; LI *et al*, 2013). Considerando que a dieta hipoproteica deste estudo foi formulada e produzida manualmente em laboratório, diferenças em relação à dieta comercial padrão podem ter contribuído para o aumento observado. Ao analisar o *Heatmap* é possível ver que níveis de nicotinamida se assemelham entre os grupos no dia 21, após o retorno da dieta comercial, o que reforça essa hipótese. Essa limitação revela a necessidade de realizar estudos adicionais sobre a composição das dietas.

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que a restrição proteico-calórica durante a lactação promove alterações significativas no perfil cardiometabólico de ratas Wistar e na composição metabolômica do leite materno, reforçando a lactação como uma janela crítica de programação metabólica, via modificação da composição do leite que nutre os filhotes. As ratas submetidas à dieta hipoproteica apresentaram menor peso corporal e adiposidade, maior sensibilidade à insulina, elevação da pressão arterial sistólica e redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos, evidenciando que essa intervenção impacta de forma relevante a saúde materna. A análise metabolômica revelou diferenças claras no perfil do leite entre os grupos, independentemente do dia de coleta. O leite do grupo LP apresentou aumento de progesterona, nicotinamida, LPE 18:0 e SM 18:1;O2/16:0, além de redução de 17- $\beta$ -estradiol nos períodos iniciais da lactação. Este perfil do leite aponta para um quadro de estresse metabólico e inflamatório na lactente. Apesar deste trabalho não ter investigado marcadores inflamatórios nas ratas LP, outros autores já mostraram que a restrição proteica severa causa um perfil de inflamação sistêmica de baixo grau nesses animais, portanto esse trabalho poderia se beneficiar de uma investigação desses marcadores. Esses achados evidenciam que a dieta materna durante a lactação modifica qualitativamente o leite, potencialmente influenciando a programação metabólica dos filhotes. Em conjunto, os resultados destacam a importância de considerar não apenas os efeitos da restrição proteico-calórica sobre a prole, mas também seus impactos diretos sobre a saúde materna e a composição do leite, contribuindo para o avanço do entendimento em DOHaD e reforçando a necessidade de estudos futuros que aprofundem a relação entre dieta materna, qualidade do leite e desfechos metabólicos a longo prazo.

De forma geral, o presente trabalho demonstrou que a restrição proteico-calórica durante a lactação promove alterações significantes no perfil cardiometabólico materno e na composição de metabólitos do leite. Esses achados se beneficiariam de análises complementares do leite materno, incluindo a quantificação de lipídeos totais, proteínas totais e carboidratos totais, a fim de integrar os achados metabolômicos com parâmetros clássicos de composição nutricional. Além disso, abordagens ômicas adicionais, como a proteômica e a lipidômica, poderiam ampliar a compreensão dos efeitos da restrição proteico-calórica sobre a qualidade do leite, contribuindo para uma caracterização mais abrangente das

modificações induzidas pela dieta durante a lactação. Essas análises integradas são capazes de contribuir para um entendimento mais abrangente do impacto da dieta materna durante a lactação, fortalecendo a relevância do modelo experimental e fomentando futuras investigações no contexto do DOHaD.

## REFERÊNCIAS

AGNOUX, A. M., *et al.* Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: potential role on pup growth and metabolic status. *J Nutr Biochem* Vol. 26, n. 7, p. 784–795. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.02.012>>

AIRES, M. A. *Fisiologia*. 5. ed. - Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA. 2018.

BARKER, D.J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. Vol. 1, n. 8489, p. 1077-1081. Maio 1986.

BAUTISTA, C. J. *et al.* Effects of Maternal Protein Restriction during Pregnancy and Lactation on Milk Composition and Offspring Development *British Journal of Nutrition*. Vol. 122, no. 2. p. 141–51. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0007114519001120>>

BERGMEYER, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis I*. 2nd Edition, Academic Press, New York, 1974.

BOUDONCK, K. J.; MITCHELL, M. W.; WULFF, J. *et al.* Characterization of the biochemical variability of bovine milk using metabolomics. *Metabolomics*. Vol. 5, p. 375–386. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0160-8>

BRAVI F.; WIENS F.; DECARLI A.; DALPONT A.; AGOSTONI C.; FERRARONI M. Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*.. p. 646-662. Setembro 2016.

CABONI, P.; MURGIA, A.; PORCU, A.; MANIS, C.; IBBA, I.; CONTU, M.; SCANO, P. A metabolomics comparison between sheep's and goat's milk, *Food Research International*, Vol. 119, p. 869-875, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.071>.

CANUTO, G. A. B.; COSTA J. L.; DA CRUZ, P. L. R.; DE SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. Quím. Nova vol. 41 n. 1. Jan, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>

CERVANTES, A. SMITH, T.R.; YOUNG, J.W. Effects of Nicotinamide on Milk Composition and Production In Diary Cows Fed Supplemental Fat1. Journal of Dairy Science, Vol. 79, n. 1, p. 105-113. 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76340-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76340-3)>

COLLET, T-H. et al. A Metabolomic Signature of Acute Caloric Restriction, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Vol. 102, n. 12, p. 4486–4495. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/jc.2017-01020>>

DE BRITO ALVES, J. L.; NOGUEIRA, V. O.; OLIVEIRA, G. B. *et al.* Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. British Journal of Nutrition. Vol.111, n. 4 p. 606-615. 2014. Disponível em: doi:10.1017/S0007114513002833

DE OLIVEIRA, J. C.; LUDEMANN CAMARGO, R.; BARELLA, L. F.; CHAVES SOUTO BRANCO, R. *et al.* Anesthetic-induced transient hyperglycemia and insulin resistance do not depend on the sympathoadrenal axis. Minerva Endocrinol, 38, n. 4, p. 379-388, Dec 2013.

EWING, J.F.; JANERO, D.R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. Analytical Biochemistry. Vol. 232, n. 2, p. 243-8. 1995.

FACCHI, J. C. et al. Perinatal programming of metabolic diseases: The role of glucocorticoids. Metabolism. Vol. 104, 154047. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.154047>>

GATTO, L.; GIBB, S.; RAINER, J. MSnbase, efficient and elegant R-based processing and visualisation of raw mass spectrometry data. [s. l.], 30 abr. 2020. DOI 10.1101/2020.04.29.067868. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.04.29.067868>.

GATTO, L.; LILLEY, K. S. MSnbase-an R/Bioconductor package for isobaric tagged mass spectrometry data visualization, processing and quantitation. Bioinformatics, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 288–289, 15 jan. 2012. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr645>.

GIBELLINI, F.; SMITH, T. K. The Kennedy pathway—De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. Vol. 62, n. 6, p. 414-428. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/iub.337>

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental plasticity and human disease: research directions. J Intern Med, 261, n. 5, p. 461-471, Maio 2007.

GOVIC, A. et al. Calorie restriction and corticosterone elevation during lactation can each modulate adult male fear and anxiety-like behaviour Hormones and Behavior.

Vol. 66, n. 4, p. 591-601. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.08.013>>

GRAVENA, C., ANDREAZZI, A. E., MECABÔ, F. T., GRASSIOLLI, S., SCANTAMBURLO, V. M., & MATHIAS, P. C. F. Protein restriction during lactation alters the autonomic nervous system control on glucose-induced insulin secretion in adult rats. *Nutritional Neuroscience*, Vol. 10, n. 1–2, p. 79–87. Setembro, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10284150701308693>.

GUO, S.; ZHOU, D.; ZHANG, M. et al. Monitoring changes of docosahexaenoic acid-containing lipids during the recovery process of traumatic brain injury in rat using mass spectrometry imaging. *Sci. Rep.* Vol. 7, p. 5054. 2017.

HISANO, K. *et al.* Structurally different lysophosphatidylethanolamine species stimulate neurite outgrowth in cultured cortical neurons via distinct G-protein-coupled receptors and signaling cascades, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 534, p. 179-185. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.119>.

HISHIKAWA, D. et al. Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *Journal of Lipid Research*. Vol. 55, n. 5, p. 799 – 807. 2014.

HOFFMAN, D. J.; REYNOLDS, R. M.; HARDY, D. B. Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. *Nutrition Reviews*. Vol. 75, n. 12, p. 951–970, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nutrit/nux053>>

HUANG, L. et al. Effects of nicotinamide riboside supplementation during late gestation and lactation on sow performance, milk metabolome, and gut microbiome. *Research Square*. 2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-7485266/v1>>

JOSEPH, D.N.; WHIRLEDGE, S. Stress and the HPA Axis: Balancing Homeostasis and Fertility. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 18, n. 10, 2224. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms18102224>>

KANG, W.; LEE, M. S.; BAIK, M. Dietary Protein Restriction Alters Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity in Rats. *Asian-Australasian Journal Of Animal Sciences*, vol. 24, n. 9, p. 1274–1281, 24 ago. 2011.

LI, D.; TIAN, Y.J.; GUO, J. et al. Nicotinamide supplementation induces detrimental metabolic and epigenetic changes in developing rats. *Br J Nutr*. Vol. 110, n. 12, p. 2156-64. 2013. Disponível em: <doi: 10.1017/S0007114513001815>

LING, P.R. et al. Effects of protein malnutrition on IL-6-mediated signaling in the liver and the systemic acute-phase response in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. Vol. 287, n. 4. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00715.2003>>

MAGIAKOU, M.A.; MASTORAKOS, G.; WEBSTER, E.; CHROUSOS, G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* , 816, 42–56. 1997.

MARINCOLA, F. C.; DESSÌ, A.; CORBU, S.; REALI, A.; FANOS, V. Clinical impact of human breast milk metabolomics, *Clinica Chimica Acta*, Vol. 451, Parte A, p. 103-106, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.02.021>.

MARTINS, I. P., *et al.* Protein-caloric restriction induced HPA axis activation and altered the milk composition imprint metabolism of weaned rat offspring. *Nutrition*. Volume 108, 111945. Abril de 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2022.111945>

MORETTO, V. L. *et al.* Low-Protein Diet during Lactation and Maternal Metabolism in Rats. *ISRN Obstetrics And Gynecology*, vol. 2011, p. 1–7, 20 out. 2010.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; & HOLMES, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, Vol. 29, n.11, p. 1181–1189. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/004982599238047>

NYAMUNDANDA, G., BRENNAN, L. & GORMLEY, I.C. Probabilistic principal component analysis for metabolomic data. *BMC Bioinformatics*. Vol. 11, p. 571. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-571>

PALOU, M.; TORRENS, J. M.; CASTILLO, P. *et al.* Metabolomic approach in milk from calorie-restricted rats during lactation: a potential link to the programming of a healthy phenotype in offspring. *European Journal of Nutrition*. Vol. 59, p. 1191–1204. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01979-6>

PENITENTE, A. R. *et al.* Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. *Life Sciences*, vol. 81, n. 7, p. 609–614, 1 jul. 2007.

PICÓ, C.; REIS, F.; EGAS, C.; MATHIAS, P.; MATAFOME, P. Lactation as a programming window for metabolic syndrome. *European Journal of Clinical Investigation*, Vol. 51, n. 5. 22 de Dezembro, 2020.

POLJSAK, B.; MILISAV, I. The NAD(+)-depletion theory of ageing: NAD(+) as the link between oxidative stress, inflammation, caloric restriction, exercise, DNA repair, longevity and health span. *Rejuvenation Research*, rej. Vol 19, n. 5, p. 1767.2016 Disponível em: [doi:10.1089/rej.2015.1767](https://doi.org/10.1089/rej.2015.1767)

RAMÍREZ, V., BAUTISTA, R.J., FRAUSTO-GONZÁLEZ, O. *et al.* Developmental Programming in Animal Models: Critical Evidence of Current Environmental Negative Changes. *Reprod. Sci.* Vol. 30, n. 442–463. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43032-022-00999-8>

ROCCHETTI, G.; GALLO, A.; NOCETTI, M.; LUCINI, L.; MASOERO, F. Milk metabolomics based on ultra-high-performance liquid chromatography coupled with

quadrupole time-of flight mass spectrometry to discriminate different cows feeding regimens. *Food Research International*, Vol. 134, 109279. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109279>.

SABOGAL-GUÁQUETA, A.M.; VILLAMIL-ORTIZ, J.G.; ARIAS-LONDOÑO, J.D. et al. Inverse phosphatidylcholine/phosphatidylinositol levels as peripheral biomarkers and phosphatidylcholine/lysophosphatidylethanolamine-phosphatidylserine as hippocampal indicator of postischemic cognitive impairment in rats. *Front. Neurosci.* Vol 12, p. 989. 2018.

SAHA, J. K.; XIA, J.; GRONDIN, J. M.; ENGLE, S. K. *et al.* Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230, n. 10, p. 777-784, Nov 2005.

SANTOSO, A.; HERIANSYAH, T.; ROHMAN, M.S. Phospholipase A2 is an Inflammatory Predictor in Cardiovascular Diseases: Is there any Spacious Room to Prove the Causation? *Curr Cardiol Rev.* Vol. 16, n.1, p.3-10. 2020. doi: <10.2174/1573403X15666190531111932>.

SHARMA, N.; CASTORENA, C.M.; CARTEE, G.D. Greater insulin sensitivity in calorie restricted rats occurs with unaltered circulating levels of several important myokines and cytokines. *Nutr Metab.* Vol. 9, n. 90. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-90>>

SHU T. T. et al. Emerging roles of lysophospholipids in health and disease, *Progress in Lipid Research*, Vol. 80, 101068. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101068>.

SILVEIRA P. P.; PORTELLA A. K.; GOLDANI M. Z.; BARBIERI M. A. Developmental origins of health and disease (DOHaD). *Jornal de Pediatria*. 83, 6. Rio de Janeiro. Dezembro 2007.

TOMIYAMA, A. J. et al. Low calorie dieting increases cortisol. *Psychosomatic Medicine*. Vol.72, n.4, p. 357 - 364. 2010. Disponível em: <10.1097/PSY.0b013e3181d9523c>

TOUFEXIS, D.; RIVAROLA, M.A.; LARA, H. VIAU, V. Stress and the reproductive axis. *J Neuroendocrinol.* Vol. 26, n. 9, p. 573-86. 2014. Disponível em: <doi: 10.1111/jne.12179>

TREVIÑO-VILLARREAL, J. H. *et al.* Dietary protein restriction reduces circulating VLDL triglyceride levels via CREBH-APOA5–dependent and –independent mechanisms. *JCI Insight*, vol. 3, n. 21, 1 nov. 2018.

TROPIA, F. C. *et al.* Effects of Low-Protein Diet on the Baroreflex and Bezold-Jarisch Reflex in Conscious Rats. *Nutritional Neuroscience*, vol. 4, n. 2, p. 99–107, 1 jan. 2001.

TSUKAHARA, T.; HARA, H.; HANIU, H.; MATSUDA, Y. The Combined Effects of Lysophospholipids against Lipopolysaccharide-induced Inflammation and Oxidative

Stress in Microglial Cells. *J Oleo Sci.* Vol. 1, n. 70(7), p.947-954. 2021. Disponível em: <10.5650/jos.ess21069>.

VILLAMIL-ORTIZ, J.G.; BARRERA-OCAMPO, A.; PIEDRAHITA, D. et al. BACE1 RNAi restores the composition of phosphatidylethanolamine-derivates related to memory improvement in Aged 3xTg-AD mice. *Front. Cell. Neurosci.* Vol. 10, p. 260. 2016.

WANG, B. et al. Phospholipid Remodeling in physiology and disease. *Annu Rev Physiol.* Vol. 81, p. 165-188. 2019.

WANG, H. et al. Low-protein diet during gestation and lactation increases hepatic lipid accumulation through autophagy and histone deacetylase. *AJP Endocrinology And Metabolism*, vol. 319, n. 1, p. E11–E25, 7 jan. 2020.

WHIRLEDGE, S.; CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoids and reproduction: Traffic control on the road to reproduction. *Trends Endocrinol. Metab.* Vol. 28, p. 399–415. 2017.

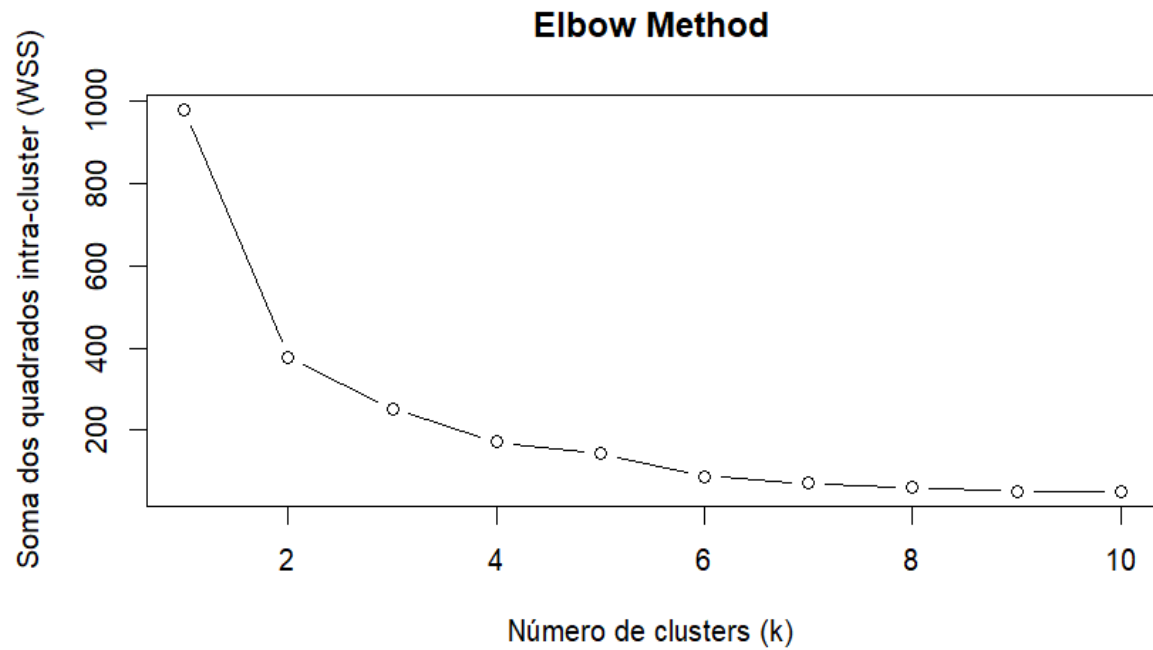
WINDELOV, J. A.; PEDERSEN, J.; HOLST, J. J. Use of anesthesia dramatically alters the oral glucose tolerance and insulin secretion in C57Bl/6 mice. *Physiol Rep*, 4, n. 11, Jun 2016.

YAMAMOTO, Y.; SAKURAI, T.; CHEN, Z.; INOUE, N.; CHIBA, H.; HUI, S.-P. Lysophosphatidylethanolamine Affects Lipid Accumulation and Metabolism in a Human Liver-Derived Cell Line. *Nutrients.* Vol. 14, n.3, p. 579. 2022, Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/nu14030579>>

YU, J. et al. The effects of maternal and perinatal factors on human milk lipids composition. *Journal of Food Composition and Analysis.* Vol. 123, 105596. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105596>>.

YUAN Y. et al. Human milk sphingomyelin: Function, metabolism, composition and mimicking. *Food Chemistry.* Vol. 447, 138991. 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138991>>

## APÊNDICE A – Método de cotovelo



MÉTODO DE COTOVELO (ELBOW METHOD): Análise estatística realizada para definir o número de grupos (*clusters*) a utilizar nos gráficos de *k-means*.

## APÊNDICE B – Espectros de fragmentação dos metabólitos anotados

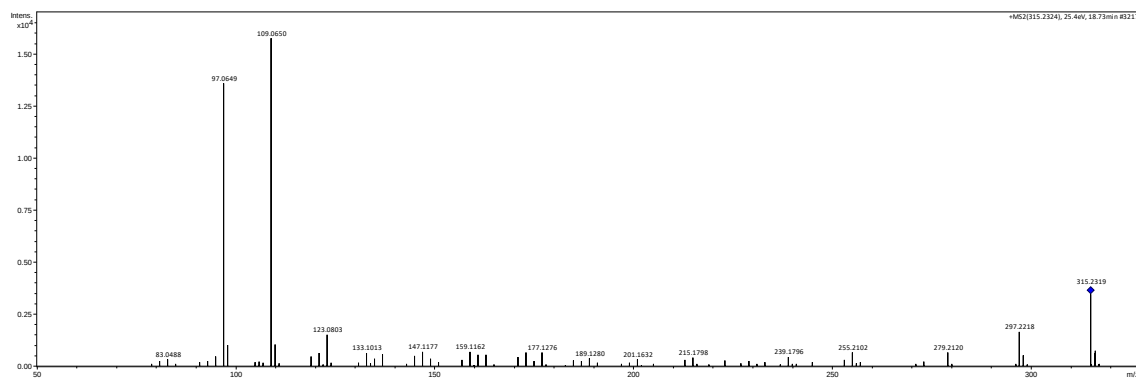


Figura AP 1. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de progesterona [M+H]<sup>+</sup>. Detectada em 18,73 min. Erro de massa: -1,90 ppm.

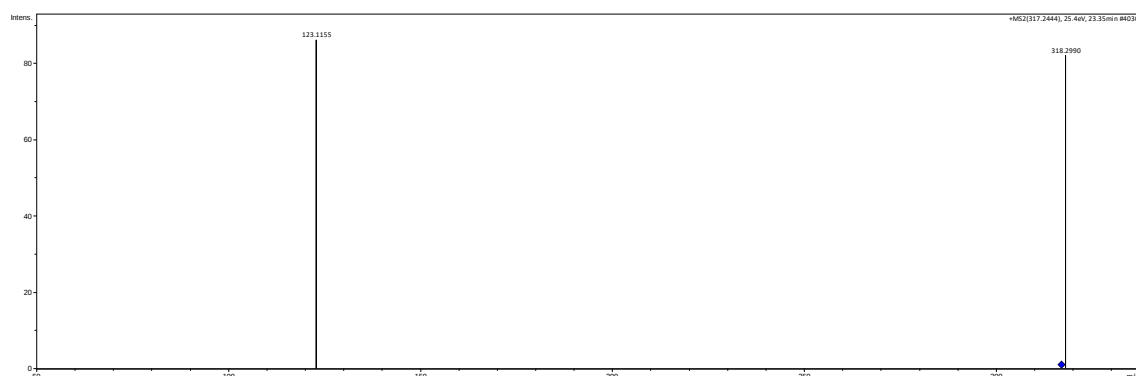


Figura AP 2. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de dihidroprogesterona [M+H]<sup>+</sup>. Detectada em 23,35 min. Erro de massa: 9,66 ppm,

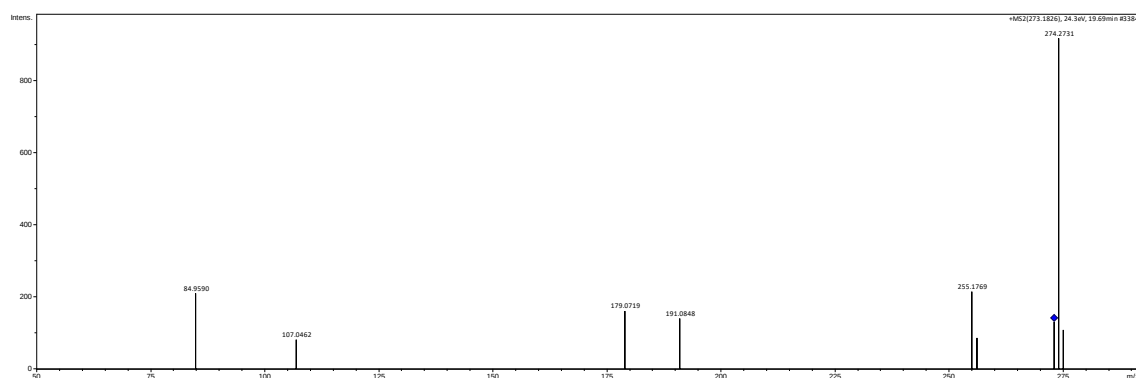


Figura AP 3. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de estradiol [M+H]<sup>+</sup>. Detectada em 19,69 min. Erro de massa: 8,41 ppm.

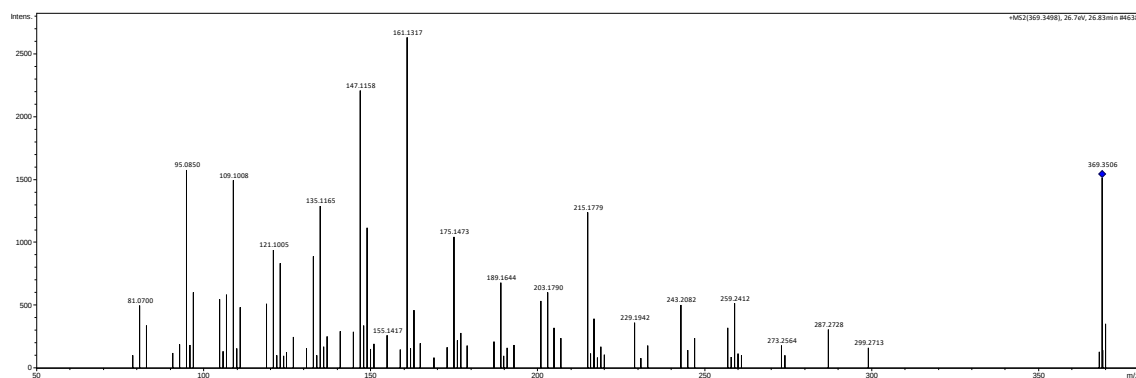


Figura AP 4. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de colesterol  $[M+H-H_2O]^+$ . Detectada em 26,83 min. Erro de massa: 4,60 ppm.

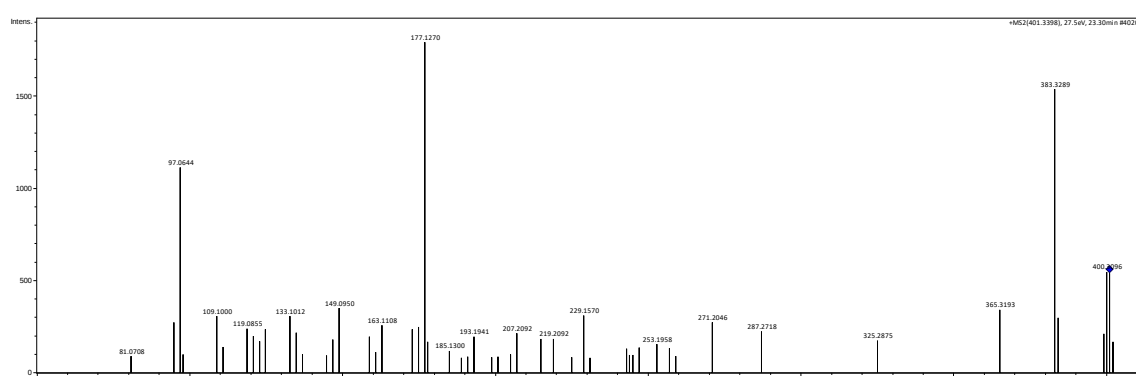


Figura AP 5. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de 7-hidroxi-4-colesten-3-ona  $[M+H]^+$ . Detectada em 23,30 min. Erro de massa: 3,98 ppm.

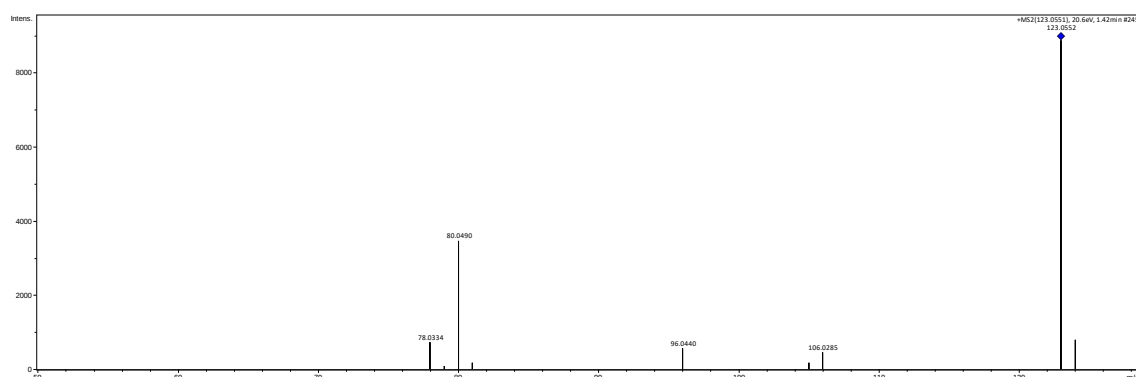


Figura AP 6. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de niacinamida  $[M+H]^+$ . Detectada em 1,42 min. Erro de massa: 0,81 ppm.

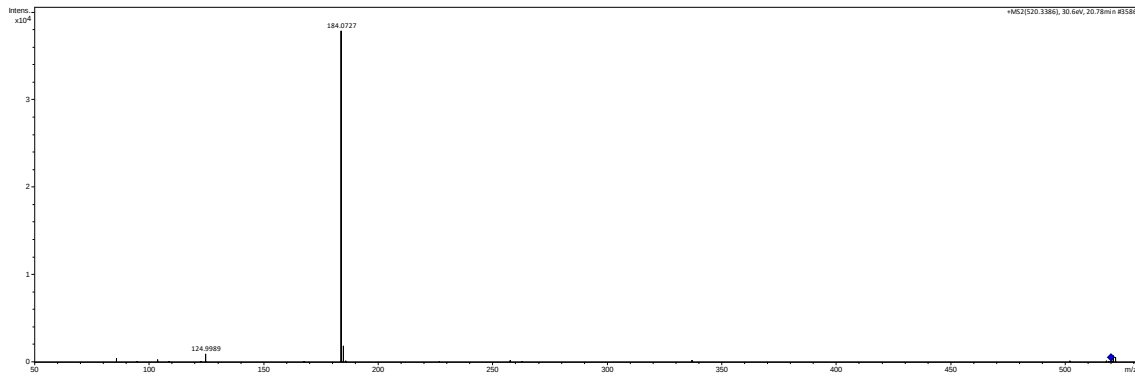


Figura AP 7. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de LPC 18:2  $[M+H]^+$ . Detectada em 20,78 min. Erro de massa: 2,11 ppm.

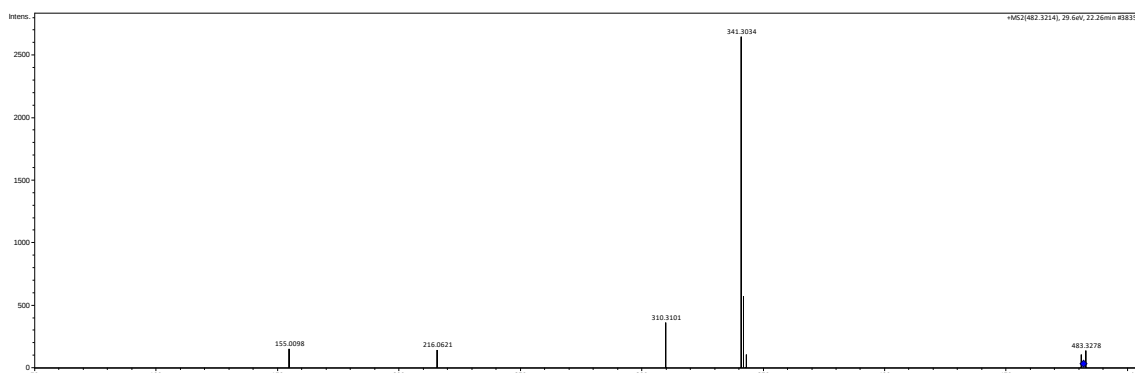


Figura AP 8. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de LPE 18:0  $[M+H]^+$ . Detectada em 22,26 min. Erro de massa: 5,59 ppm.

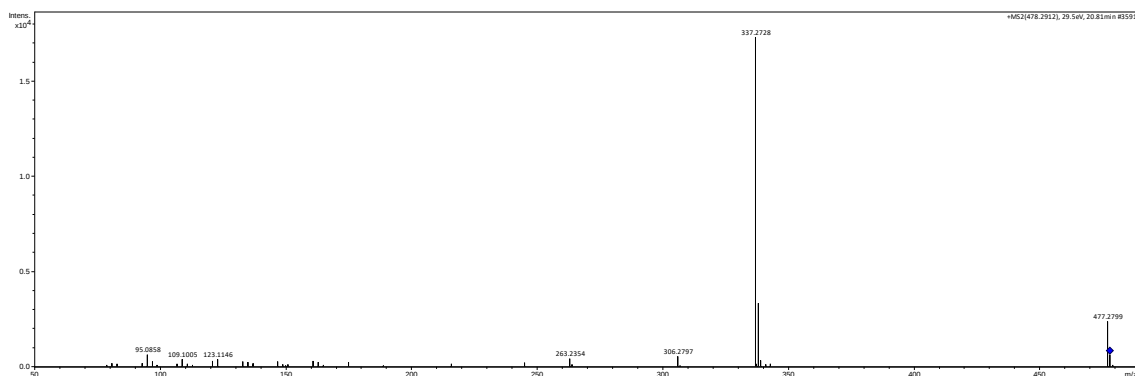


Figura AP 9. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de LPE 18:2  $[M+H]^+$ . Detectada em 20,81 min. Erro de massa: 3,34 ppm.

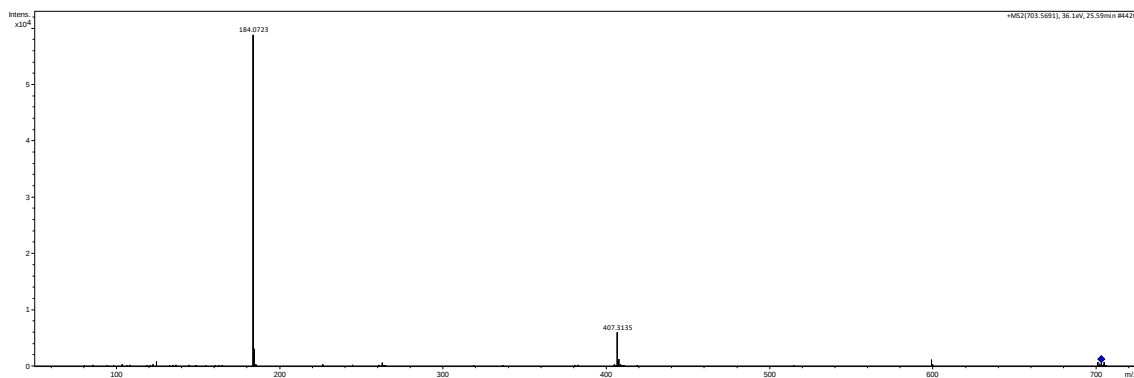


Figura AP 10. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de SM 18:1;O<sub>2</sub>/16:0 [M+H]<sup>+</sup>. Detectada em 25,59 min. Erro de massa: 8,10 ppm.

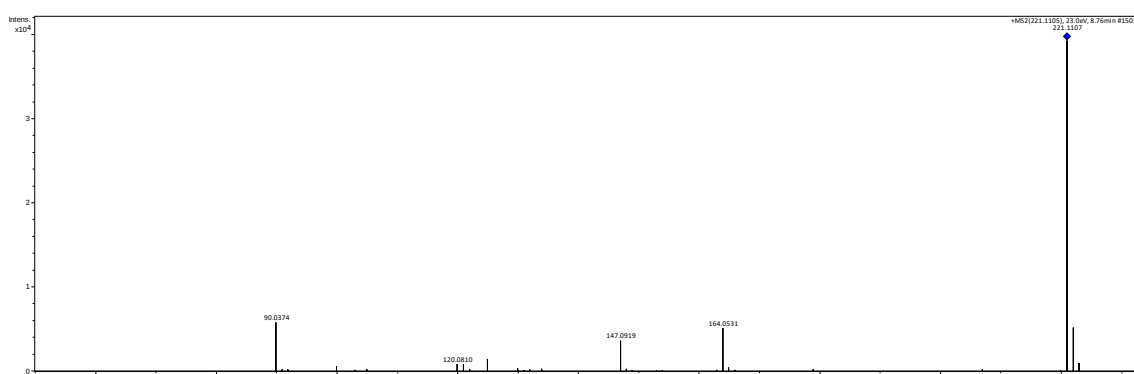


Figura AP 11. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de xilazina [M+H]<sup>+</sup>. Detectada em 8,76 min. Erro de massa: 0,45 ppm.

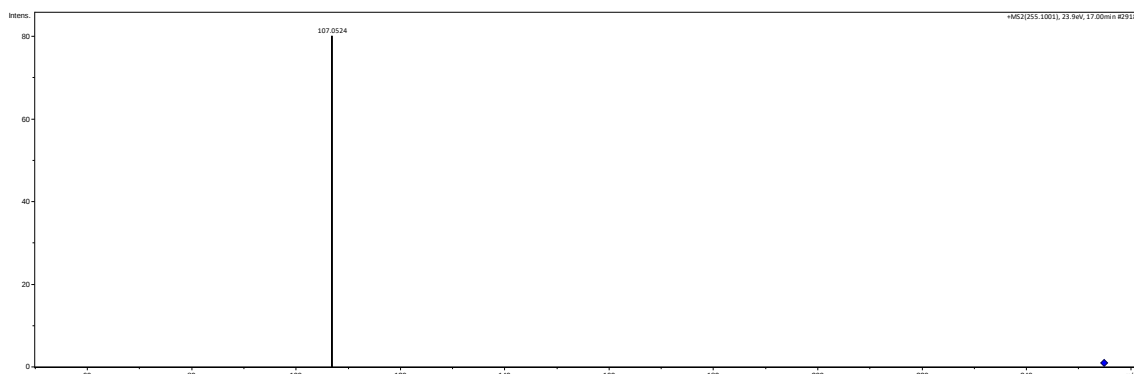


Figura AP 12. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de ketoprofeno [M+H]<sup>+</sup>. Detectada em 17,00 min. Erro de massa: 5,48 ppm.

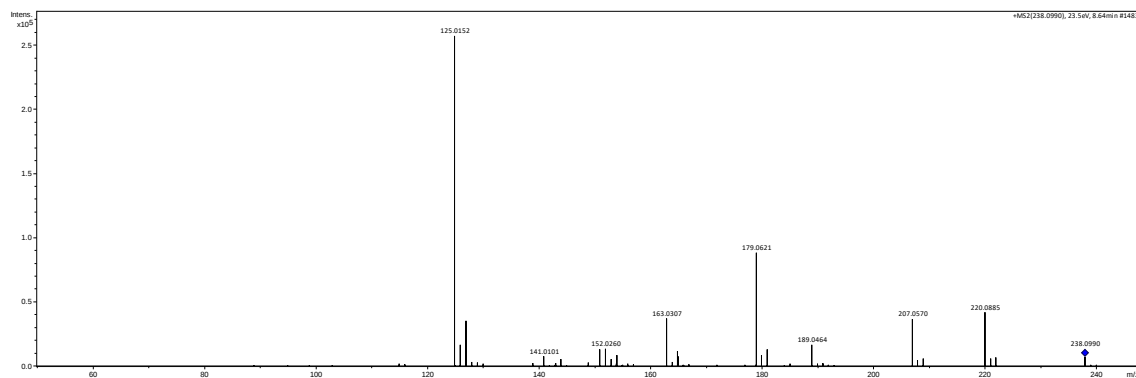


Figura AP 13. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de ketamina  $[M+H]^+$ . Detectada em 8,64 min. Erro de massa: 1,25 ppm.

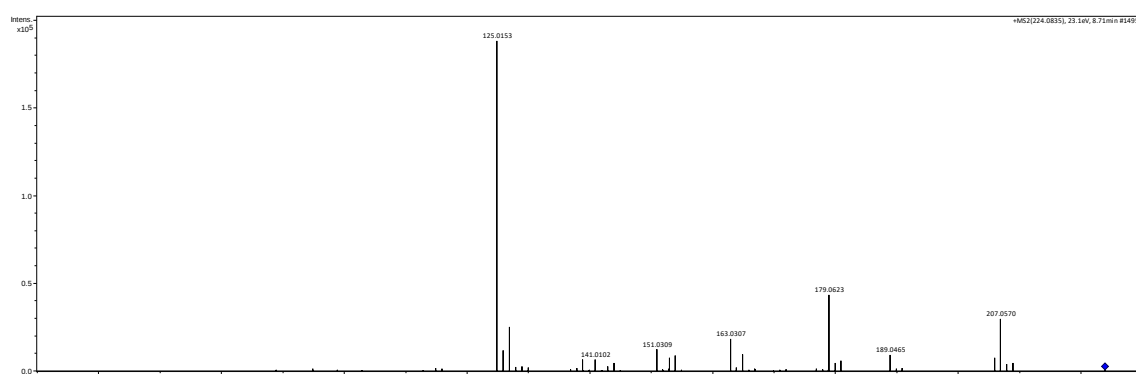


Figura AP 14. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de norketamina  $[M+H]^+$ . Detectada em 8,71 min. Erro de massa: 0,44 ppm.

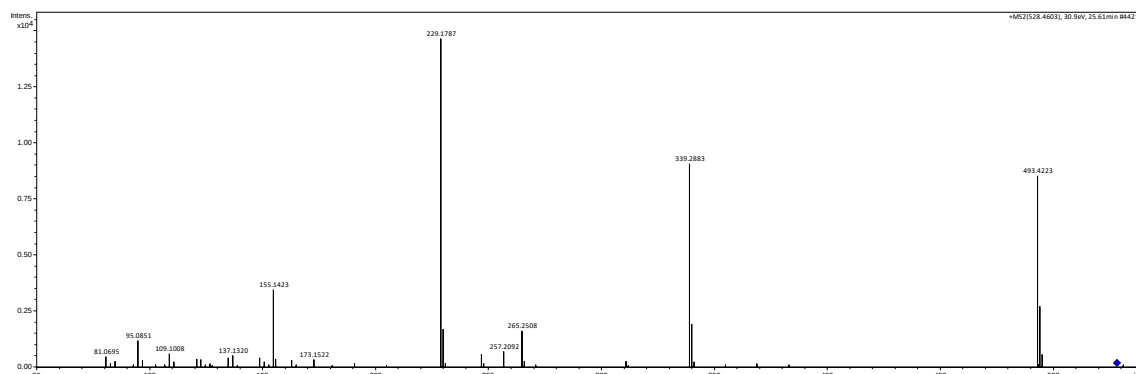


Figura AP 15. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de DG(10:0/18:1)  $[M+NH_4]^+$ . Detectada em 25,61 min. Erro de massa: 3,59 ppm.

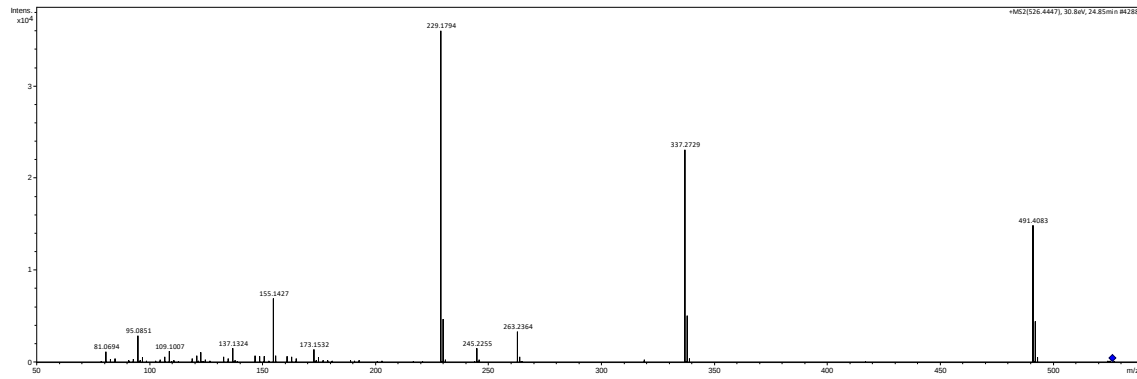


Figura AP 16. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de DG(10:0/18:2) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>. Detectada em 24,85 min. Erro de massa: 3,60 ppm.

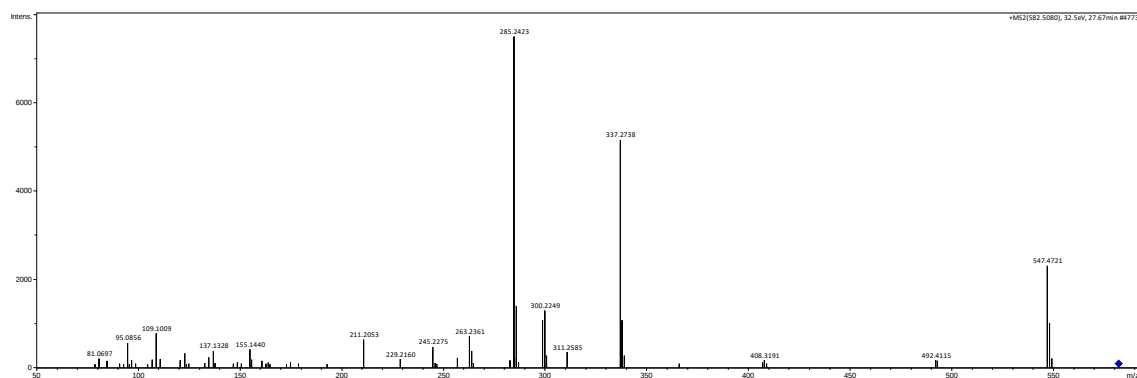


Figura AP 17. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de DG(14:0/18:2) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>. Detectada em 27,67 min. Erro de massa: 2,06 ppm.

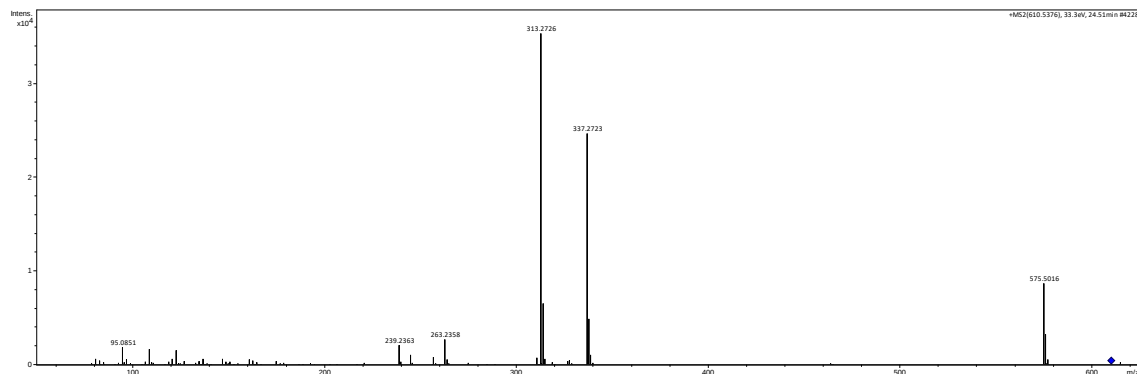


Figura AP 18. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de DG(16:0/18:2) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>. Detectada em 24,51 min. Erro de massa: 4,79 ppm.

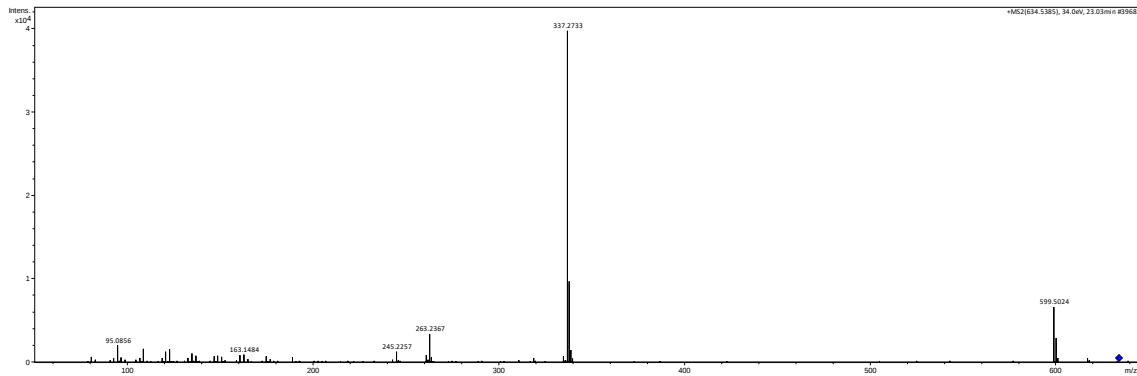


Figura AP 19. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de DG(18:2/18:2)  $[M+NH_4]^+$ . Detectada em 23,03 min. Erro de massa: 3,15 ppm.

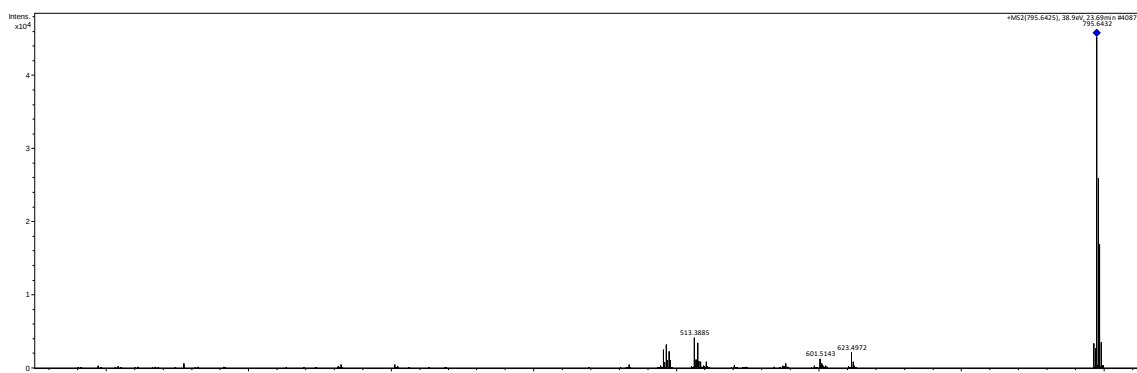


Figura AP 20. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de TG(10:0/18:1/18:2)  $[M+Na]^+$ . Detectada em 23,69 min. Erro de massa: 6,03 ppm.

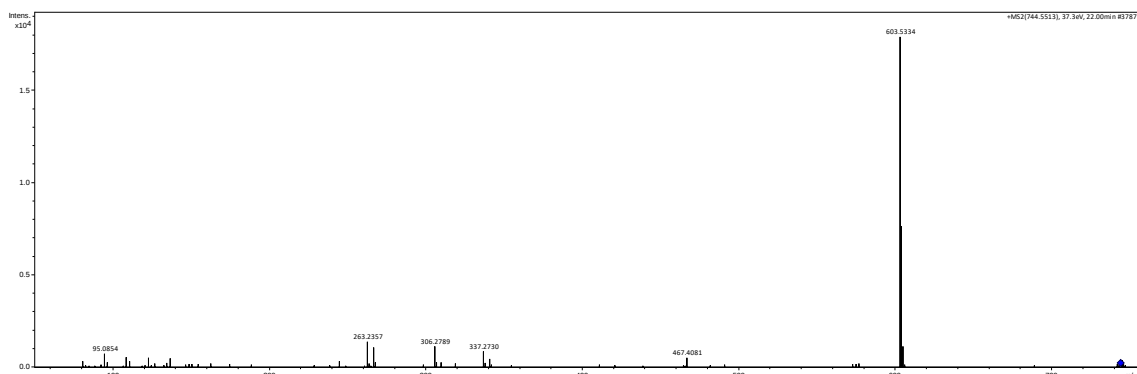


Figura AP 21. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de Fosfatidiletanolamina (20:1/16:1)  $[M+H]^+$ . Detectada em 22,00 min. Erro de massa: 3,22 ppm.

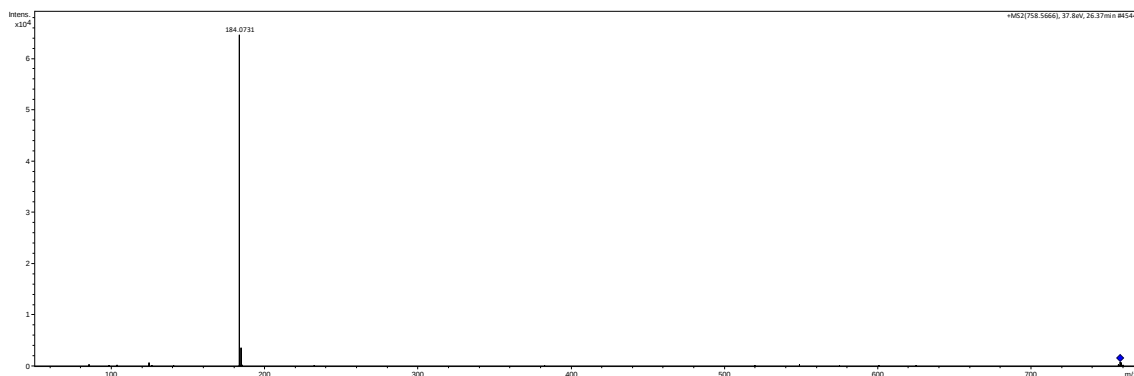


Figura AP 22. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de PC(34:2)  $[M+H]^+$ . Detectada em 26,37 min. Erro de massa: 3,69 ppm.

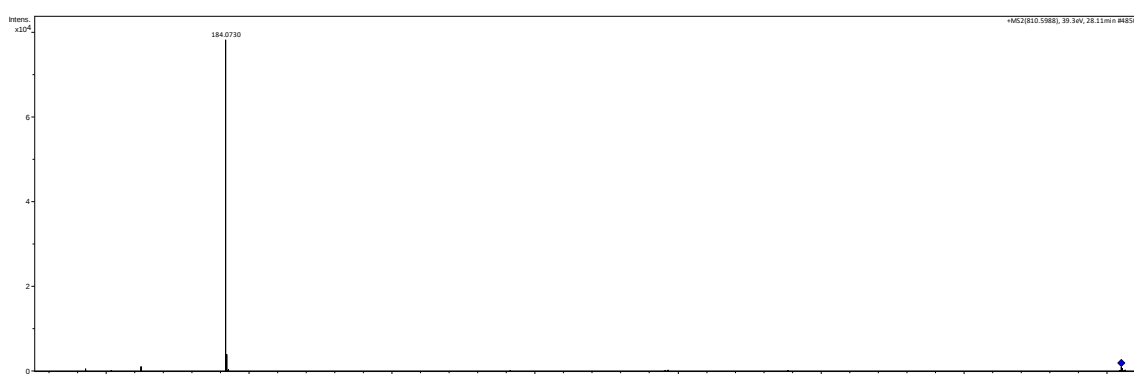


Figura AP 23. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de PC(38:4)  $[M+H]^+$ . Detectada em 28,11 min. Erro de massa: 2,34 ppm.

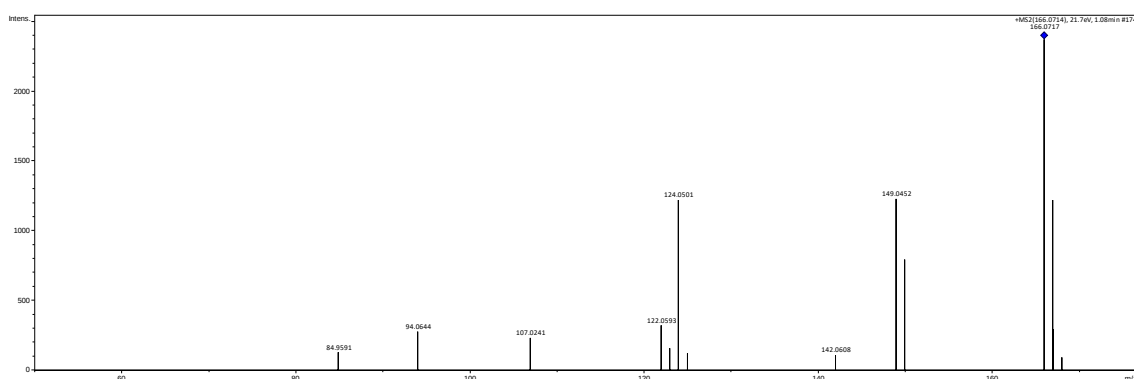


Figura AP 24. Espectro de fragmentação (MS/MS) correspondente à molécula de 9-Metilguanina  $[M+H]^+$ . Detectada em 1,08 min. Erro de massa: 5,41 ppm.