

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**EFEITOS DE DIFERENTES DIETAS SOBRE O METABOLISMO DE LIPÍDEOS
E DE CARBOIDRATOS EM RATAS NORMONUTRIDAS E DESNUTRIDAS**

KALLY JANAINA BERLEZE

ORIENTADOR

PROF. DR. MARCOS LUIZ SANTOS PERRY

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas com área de concentração em Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas-Bioquímica.

Porto Alegre

2005

De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre começando,
a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que podemos ser
interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho
novo... da procura um encontro. E assim terá valido a pena...

(Fernando Sabino)

Este trabalho é dedicado ao meu pai Nery Antônio Berleze e ao meu irmão Christiano pelo incentivo, e em especial ao meu irmão Diovanne Berleze, por ter oportunizado a realização deste trabalho e pela sua confiança.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcos Luiz Santos Perry, pela orientação, apoio e compreensão na execução deste trabalho.

À Coordenação de Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, pela consideração, oportunizando a obtenção deste grau acadêmico.

À amiga Letícia Schmidt pela colaboração constante na execução prática deste trabalho e pela sua amizade.

À Liane pela orientação na escrita e apoio na execução prática deste trabalho.

Ao colega Alexandre Muller pelo apoio na execução deste trabalho e pela sua amizade.

À Ingrid pela receptividade no laboratório, pelo apoio e convivência.

Aos bolsistas Fernando e Cíntia pela receptividade no laboratório e pelo apoio e convivência.

As bolsistas Lisiane e Cristina pelo apoio e convivência no laboratório.

Aos funcionários de Departamento de Bioquímica de UFRGS pelos seus préstimos.

A todos os familiares, amigos, colegas e professores que direta ou indiretamente incentivaram e colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Figuras	vii
Resumo	viii
Summary	x
1. Introdução	1
1.1 Evidências Epidemiológicas Humanas para a Programação de Desordens Metabólicas	2
1.2 A Hipótese do Fenótipo Econômico	4
1.3 Fatores que Influenciam o Crescimento e o Desenvolvimento Fetal	5
1.3.1 Impacto da Restrição de Proteínas	5
1.3.2 Impacto dos Hormônios	6
1.3.2.1 Impacto dos Glicocorticóides	7
1.4 Ontogenia da Célula β	9
1.5 Apoptose e Remodelação das Ilhotas de Langerhans Durante o Início do Desenvolvimento Pós-Natal	11
1.6 Alterações Causadas por um Ambiente Nutricional Inadequado em Períodos Críticos do Crescimento e do Desenvolvimento Fetal e Início do Pós-Natal	13
1.7 Objetivos	21
2. Materiais e Métodos	22
2.1 Material	23
2.1.1 Reagentes	23
2.1.2 Obtenção do Soro	23
2.1.3 Análise do Soro	24
2.1.4 Animais Experimentais	24
2.2 Métodos	25
2.2.1 Modelos de Desnutrição e Modelo de Obesidade	25
2.2.2 Grupos Experimentais	25

2.2.3	Dietas	27
2.2.4	Parâmetros Analisados	31
2.2.4.1	Teste de Resistência à Insulina	31
2.2.4.2	Teste de Tolerância à Glicose	31
2.2.4.3	Modelo Experimental de Incorporação <i>in vitro</i> de Glicose Proveniente de D-[U ¹⁴ C]-Frutose, de L-[U- ¹⁴ C]-Glicerol e de D-[U- ¹⁴ C]-Glicose ao Glicogênio Hepático	31
2.2.4.4	Determinação da Concentração Hepática de Glicogênio	32
2.2.4.5	Determinação da Concentração Hepática de Triglicerídeos	33
2.2.4.6	Modelo Experimental de Captação de D-[U- ¹⁴ C]-Deoxiglicose em Fatias de Músculo Sóleo	33
2.2.5	Análises Estatísticas	33
3.	Resultados	34
4.	Discussão	70
5.	Conclusões	87
6.	Referências Bibliográficas	91

ABREVIATURAS

AG: Ácido Graxo

AGNE: Ácido graxo não esterificado

ALP: Fosfatase alcalina

ALT: Alanina aminotransferase

AOAC: Análises da Associação de Química Analítica

AST: Aspartato aminotransferase

DAG: Diacilglicerol

DM II: Diabete Mellitus Tipo II

GLUT: Transportador de Glicose

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

HDL: Lipoproteína de alta densidade

¹H MRS: Spectroscopia de Ressonância Magnética de ¹H

i.p.: Intraperitonal

I: Insulina

IAPP: Polipeptídeo amilóide das ilhotas

IGF-1: Fator I de crescimento semelhante á insulina

IGF-2: Fator II de crescimento semelhante á insulina

IGFBPs: Proteínas de ligação dos fatores de crescimento semelhante à insulina

iNOS: Enzima óxido nítrico sintase induzível

IR: Receptor de insulina

IRS-1: Substrato-1 receptor de insulina

KRb: Krebs Ringer bicarbonato

p:v: Peso por volume

PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

PKC-θ: Proteína quinase C teta

POPOP: 1,4-bis-5-fenil-2-oxazolilbenzeno

PPO: 2,2-difeniloxazole

PTPs: Proteína tirosina fosfatase

TG: Triglicerídeos

TGF- β : Fator β de transformação de crescimento

TNF- α : Fator α de Necrose Tumoral

TSI: Teste de Sensibilidade à Insulina

TTG: Teste de Tolerância à Glicose

VLDL: Lipoproteína de muito baixa intensidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas com proteína isolada de soja como fonte protéica	27
Tabela 2: Composição das dietas com caseína como fonte protéica	28
Tabela 3: Composição da dieta hipercalórica	29
Tabela 4: Composição da dieta comercial	30

Efeitos da Desnutrição Pré-Gestacional, Gestacional e Lactacional Sobre o Metabolismo Hepático de Carboidratos em Ratas com 2 Meses de Idade.

Tabela 5: Concentração Hepática de glicogênio e incorporação <i>in vitro</i> de glicose proveniente de [U- ¹⁴ C]-Frutose, de [U- ¹⁴ C]-Glicerol e de [U- ¹⁴ C]-glicose ao glicogênio hepático	37
Tabela 6: Glicemia	38

Efeitos da Desnutrição Crônica desde o Período Gestacional até os 4 Meses de Idade sobre o Metabolismo de Carboidratos e de Lipídeos em Ratas.

Tabela 7: Relação peso do fígado/100 g massa corporal	42
Tabela 8: Relação do tecido adiposo total/100 g massa corporal	43
Tabela 9: Concentração plasmática de albumina	44
Tabela 10: Concentração hepática de glicogênio e incorporação <i>in vitro</i> de glicose proveniente de [U- ¹⁴ C]-Glicerol ao glicogênio hepático em fatias de fígado	45
Tabela 11: Captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo	46
Tabela 12: Glicemia	49
Tabela 13: Concentração hepática e plasmática de triglicerídeos	50
Tabela 14: Concentração plasmática de: HDL-colesterol, colesterol total e lipídeos totais--	51
-	
Tabela 15: Atividade de enzimas plasmáticas em ratas	52

Efeitos da Desnutrição Gestacional e Lactacional Associado à Dieta Normoprotéica (25%) e Hiperlipídica (42%) a partir do Desmame até 4 e 8 Meses de Idade sobre o Metabolismo de Carboidratos e de Lipídeos em Ratas.

Tabela 16: Relação peso do fígado/100 g massa corporal em ratas com 4 e 8 meses de idade	56
Tabela 17: Relação do tecido adiposo total e visceral/100 g massa corporal em ratas com 4 e 8 meses de idade	57
Tabela 18: Concentração plasmática de albumina em ratas com 4 e 8 meses de idade	58
Tabela 19: Concentração hepática de glicogênio e incorporação <i>in vitro</i> de glicose proveniente de [U- ¹⁴ C]-Glicerol ao glicogênio hepático em fatias de fígado de ratas com 4 e 8 meses de idade	59
Tabela 20: Captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo de ratas com 4 e 8 meses de idade	60
Tabela 21: Glicemia em ratas com 4 e 8 meses de idade	61
Tabela 22: Concentração hepática e plasmática de triglicerídeos em ratas com 4 e 8 meses de idade	66
Tabela 23: Concentração plasmática de: HDL-colesterol, colesterol total e lipídeos totais em ratas com 4 e 8 meses de idade	67
Tabela 24: Atividade de enzimas plasmáticas em ratas com 4 e 8 meses de idade	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação Esquemática da Influência de Eventos em Períodos Críticos do Crescimento e do Desenvolvimento na Progressão de Doenças Metabólicas na Vida Adulta - 19

Efeitos da Desnutrição Crônica desde o Período Gestacional até os 4 Meses de Idade sobre o Metabolismo de Carboidratos e de Lipídeos em Ratas.

Figura 2: Massa Corporal 40

Figura 3: Consumo de Ração 41

Figura 4: Teste de Tolerância à glicose após a injeção i.p. de glicose (2,0 g/Kg Rato) 47

Figura 5: Teste de sensibilidade à insulina após a injeção i.p. de insulina (0,75 mU/kg rato) 48

Efeitos da Desnutrição Gestacional e Lactacional Associado à Dieta Normoprotéica (25%) e Hiperlipídica (42%) a partir do Desmame até 4 e 8 Meses de Idade sobre o Metabolismo de Carboidratos e de Lipídeos em Ratas.

Figura 6: Massa Corporal 54

Figura 7: Consumo de Ração 55

Figura 8: Teste de sensibilidade à insulina após a injeção i.p. de insulina (1,0 mU/kg rato)- 62

Figura 9: Teste de tolerância à glicose após a injeção i.p. de glicose (2,0 g/kg rato) 63

Figura 10: Captação de glicose estimulada pela insulina no músculo esquelético de ratos no estado de jejum de 18 a 24 horas 85

RESUMO

A hipótese do fenótipo econômico propõe que a associação epidemiológica entre a restrição de crescimento intra-uterino e subsequente desenvolvimento de Diabetes Mellitus Tipo II (DM II) e a Síndrome Plurimetabólica resultam dos efeitos da má nutrição durante períodos críticos do crescimento e do desenvolvimento, que produz mudanças permanentes no metabolismo da glicose. Estas mudanças incluem capacidade reduzida para a secreção de insulina e resistência a insulina que, combinada com os efeitos da obesidade, do envelhecimento e da inatividade física, são fatores muito importantes no desenvolvimento do DM II.

As ratas foram divididas em cinco grupos. Dois grupos receberam durante a gestação as seguintes dietas: grupo desnutrido e normonutrido: 7% e 25% de proteína e 10% de lipídio (óleo de soja), respectivamente. Após o nascimento as ratas continuaram com a dieta ofertada às mães até os 4 meses de idade. Grupo hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos: 7% e 25% de proteína e 15% de lipídio (óleo de soja) durante a gestação e a lactação. Após o período lactacional as ratas dos grupos hiperlipídicos foram submetidas a uma dieta contendo 25% de proteína e 42% de lipídio (40 de banha de porco + 2% óleo de soja) até aos 8 meses de idade. O grupo que foi submetido a dieta comercial recebeu esta dieta durante a gestação e o período pós-natal.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar: I. Massa corporal; II. Relação tecido adiposo visceral/100 g massa corporal; III. Glicemia; IV. Concentração hepática de triglicerídeos; V. Captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo; VI. Teste de Sensibilidade à Insulina (TSI); VII. Teste de Tolerância à Glicose (TTG).

Verificamos no presente trabalho que no grupo desnutrido: (i) a massa corporal foi menor em todas as idades avaliadas; (ii) a captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo foi 29,8% maior; (iii) no TTG a glicemia foi menor aos 30, 60 e 120 minutos após a injeção i.p. de glicose; (iiii) no TSI a glicemia foi menor aos 30 e 60 minutos após a injeção i.p. de insulina em relação ao grupo normonutrido.

Verificamos, também, no presente trabalho que no grupo hipoprotéico hiperlipídico: (i) a relação do tecido adiposo total e visceral/100 g massa corporal foi maior nas duas idades estudadas; (ii) a captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo apresentou uma

redução de 15,35%; (iii) a concentração plasmática de glicose foi 11,8% maior; (iiii) no TTG a glicemia foi maior, aos 30 e 60 minutos, após a injeção i.p. de glicose; (iiiii) a concentração hepática de triglicérides foi maior em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial.

Prévios estudos mostram que o insulto provocado pela restrição protéica durante o período fetal e lactacional aumenta a ação da insulina apesar de sua prejudicada secreção, mantendo assim uma tolerância normal à glicose. Mas, a ingestão de uma dieta hiperlipídica leva a um modesto prejuízo na ação periférica da insulina sem afetar a tolerância à glicose, em consequência da aumentada secreção de insulina. No entanto, a exposição crônica das duas intervenções dietéticas resulta em uma interação sinérgica, levando a um importante prejuízo na ação periférica da insulina em combinação com prejudicada resposta secretora de insulina, resultando em intolerância à glicose. Com estes resultados pode-se inferir que o genótipo econômico, a desnutrição durante a gestação e a lactação, uma dieta hiperlipídica e o estilo de vida sedentário são fatores que contribuem para o desenvolvimento da obesidade e consequentemente da resistência à insulina e do DM II.

SUMMARY

The hypothesis of the economic phenotype proposes that the epidemiological association between the restriction of intra-uterine growth and subsequent development of diabetes mellitus type II (DM II) and Pluri-metabolic Syndrome are results of the effects of malnutrition during critical periods of growth and development, which produces permanent changes in the metabolism of glucose. These changes include a reduced capacity to produce insulin and insulin resistance that, combined with the effects of obesity, old age and physical inactivity, are very important factors in the development of DM II.

The laboratory rats were divided into five groups. Two groups received the following diet during the gestation period: undernourished and nourished group: 7% and 25% protein and 10% lipids (soybean oil), respectively. After birth the rats continued with the diet offered to the mothers until 4 months of age. Low protein-high lipid (LPHL) and normal protein-high lipid (NPHL) group: 7% and 25% protein and 15% lipids (soybean oil) during the gestation and lactation periods, respectively. After the lactation period the rats from groups LPHL and NPHL were submitted to a diet containing 25% protein and 42% lipids (40% pork lard + 2% soybean oil) until 8 months of age. The group that was submitted to the commercial diet received this diet during the gestation and post-natal periods.

The objective of the present work was to evaluate: I. Body mass; II. Ratio of visceral adipose tissue/100g body weight; III. Blood Glucose; IV. Concentration of hepatic triglycerides; V. Disposal of 2-deoxiglucose in soleo muscle slices; VI. Insulin Sensitivity Test (IST); VII. Glucose Tolerance Test (GTT);

We verified in the present work in the undernourished group: (i) a decrease in body mass at all ages evaluated; (ii) the disposal of 2-deoxiglucose in soleo muscle slices was higher 29,8%; (iii) was higher tolerance to glucose in the GTT; (iiii) was higher insulin sensitivity in the IST in relation to the normally nourished group.

We verified also in the present work in the Low protein-high lipid group: (i) the ratio of total and visceral adipose tissue/100g body weight was higher at all ages evaluated; (ii) the disposal of 2-deoxiglucose in soleo muscle slices presented a significant decrease of 15,35%; (iii) the blood glucose was higher 11,8%; (iiii) was higher intolerance to glucose in

the GTT; (iiii) the concentration hepatic triglycerides was higher in relation to the group that was submitted to the commercial diet.

Previous studies have shown that the insult caused by the protein restriction during the fetal and lactation periods increases the action of insulin despite its impaired secretion, thus maintaining a normal tolerance to glucose. However, the ingestion of a high fat diet, leads to a modest impairment in the peripheral action of insulin without affecting the tolerance to glucose, as a consequence of the increased insulin secretion. Although, the chronic exposure to the two dietary interventions has resulted in a synergic interaction, leading to an important impairment in the peripheral action of the insulin in combination with the impaired insulin secretion response, resulting in an intolerance to glucose. With these results, it can be inferred that the economic genotype, the malnutrition during the gestation and lactation periods, a high-fat diet and a sedentary life style are factors that contribute to the development of obesity and consequentially, to insulin resistance and DMII.

INTRODUÇÃO

1.1 Evidências Epidemiológicas Humanas para a Programação de Desordens Metabólicas

Programação de desordens metabólicas consiste no processo pelo qual um estímulo ou um insulto quando aplicado em um período crítico ou sensível ao desenvolvimento, resulta em uma alteração a longo prazo ou permanente na estrutura, na função de um órgão ou em uma ação metabólica (Lucas, 1991). Uma das evidências para isto vem de estudos geográficos que mostraram que diferenças nas taxas de mortalidade de doenças cardiovasculares em diferentes áreas da Inglaterra foram fortemente relacionadas a diferenças na mortalidade neonatal (mortes antes de um mês de idade), e em indivíduos com 70 anos de idade ou mais (Barker e Osmond, 1986).

Estudos com humanos de ambos os sexos com 36, 50 e 64 anos de idade mostraram que as pressões sistólica e diastólica são menores em pessoas que tiveram os maiores pesos ao nascimento (Barker et al, 1989a; Barker et al, 1990 e Barker et al, 1992).

Hales et al (1991) mostraram que em humanos com menores pesos ao nascimento e no 1º ano de vida estão associados com o subsequente desenvolvimento de Diabetes Mellitus Tipo II (DM II) na idade adulta. Barker, em 1991 mostrou que doenças cardiovasculares na vida adulta resultam da restrição do crescimento durante a vida fetal e durante a infância. Doenças cardiovasculares, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e DM II são vistas como um efeito “programado” da interferência com o crescimento no início da vida e o desenvolvimento.

Forsdahl (1977) mostrou que muitas mortes neonatais foram associadas com baixo peso ao nascimento. Estes achados sugerem que as doenças cardiovasculares, a HAS e o DM II estão ligados à restrição do crescimento intra-uterino. Esta ligação foi, subsequentemente, demonstrada em estudos individuais com homens e mulheres cujo crescimento fetal e durante a infância foi registrado neste tempo. Entre 5654 homens aqueles que tiveram os menores pesos ao nascimento e ao um ano de idade tiveram as maiores taxas de mortalidade de cardiopatia isquêmica na idade adulta (Barker et al 1989b).

Uma relação entre o desenvolvimento fetal e neonatal e o subsequente desenvolvimento de intolerância à glicose e de Diabete Mellitus Tipo II foi demonstrada por Hales et al (1991) que observaram que a intolerância à glicose ou o DM II aumentou com a diminuição do peso ao

nascimento (Hales et al, 1991). Quando esta população foi novamente estudada com referência a Síndrome Metabólica (definida em termos de: intolerância à glicose, hipertensão e hipertrigliceridemia), observou-se que o baixo peso ao nascimento aumentava em 18 vezes a probabilidade dos indivíduos apresentarem a Síndrome (Barker et al, 1993).

Ravelli, et al 1998 estudaram os efeitos da má nutrição materna humana durante períodos específicos da gestação, trabalhando com humanos que durante a II Guerra Mundial foram submetidos à escassez de alimentos, que durou do final de novembro de 1944 até o início de maio de 1945. Indivíduos que nasceram imediatamente antes, durante e 21 meses depois da escassez foram estudados. Na vida adulta, ambos, homens e mulheres que durante o período intra-uterino atravessaram a escassez de alimentos apresentaram concentrações superiores de glicose plasmática após 2 horas do início do Teste Padrão de Tolerância à Glicose do que aqueles que não foram expostos à escassez de alimentos durante a vida fetal (Ravelli et al 1998). Observou-se que o aumento na glicose plasmática foi mais pronunciado em indivíduos expostos à escassez de alimentos durante o último trimestre da gestação. Além disso, estes indivíduos apresentaram menor peso ao nascimento, comprimento, circunferência da cabeça e área da placenta comparado aos que foram expostos à escassez durante o início da gestação e aos que não passaram pelo período de fome durante a vida fetal. No entanto, a relação circunferência da cabeça/peso ao nascimento, nos indivíduos expostos à escassez de alimentos durante o último trimestre, estava aumentada, indicando que o substrato energético para o cérebro estava preservado.

Com base em estudos epidemiológicos, estabeleceu-se uma associação entre nutrição inadequada materna e neonatal e suas conseqüências sobre a saúde na vida adulta. A restrição de crescimento intra-uterino está acompanhada por mudanças órgão-seletiva na distribuição de nutrientes, tal que o crescimento do cérebro, por exemplo, é relativamente protegido em relação ao pâncreas e ao fígado (Winick e Noble, 1996; Desai et al 1996).

1.2 A Hipótese do Fenótipo Econômico

Diversos estudos têm estabelecido uma associação entre crescimento fetal restrito e o futuro desenvolvimento de intolerância à glicose ou alguns marcadores de resistência à insulina (Petry e Hales, 1999). Em 1992 Hales e Barker propuseram a Hipótese do Fenótipo Econômico, para fornecer uma estrutura conceitual e mecanística para estas associações, que poderiam ser testadas através de pesquisas em modelos animais.

Esta hipótese sugere que, durante tempos de privação nutricional, o crescimento fetal adota no mínimo duas estratégias para ajudar na sobrevivência: (i) desvia nutrientes para o cérebro para preservar o crescimento cerebral às expensas de outros órgãos, tais como o pâncreas, o fígado e o músculo esquelético; (ii) ocorre programação metabólica, para de forma benéfica o recém-nascido sobreviver sob condições de vida pós-natal inadequadas. No entanto, se o organismo do recém-nascido se depara com uma nutrição adequada ou uma “supernutrição”, então esta reprogramação metabólica pode tornar-se prejudicial à sua saúde, resultando em Diabetes Mellitus do Tipo II, doenças cardiovasculares e hipertensão (Hales e Barker, 1992).

O feto deveria por isso ser “metabolicamente programado”, um conceito que tem sido definido como o processo pelo qual um estímulo ou um insulto quando aplicado em um período crítico ou sensível ao desenvolvimento, resulta em uma alteração em longo prazo ou permanente na estrutura ou na função de um órgão ou de uma ação metabólica (Lucas, 1991). Existem períodos restritos e especificamente críticos durante o desenvolvimento, que com frequência coincidem com os períodos de rápida divisão celular, diferenciação e maturação de órgãos e de tecidos individuais na preparação para a sobrevivência depois do nascimento. Em particular, o prejuízo no crescimento durante estes períodos causado por uma nutrição materna inadequada, resulta em um déficit irrecuperável do número celular, o dano tecidual depende da duração do insulto (McCance 1976 e Widdowson 1976).

Embora muitos fatores possam influenciar o crescimento fetal (Purdy e Metzger, 1996), a condição nutricional e hormonal materna pode ser particularmente importante (McCance e Widdowson, 1974; Strauss, 1997).

1.3 Fatores que Influenciam o Crescimento e o Desenvolvimento Fetal

1.3.1 Impacto da Restrição de Proteínas

A deficiência nutricional real que possibilita o feto tornar-se nutricionalmente “econômico” não é completamente conhecida. No entanto, a atenção tem sido direcionada para o papel potencial da deficiência de proteínas, devido à importância dos aminoácidos no crescimento fetal, no desenvolvimento das células β pancreáticas e na secreção de insulina (Hales e Barker, 1992).

A alta ingestão de carboidratos e a baixa ingestão de proteínas no início e final da gestação, respectivamente, estão associados com placenta pequena e com baixo peso ao nascimento em humanos recém-nascidos (Godfrey et al, 1996 e 1997). Nestes, a subnutrição no início da gestação está relacionado a recém-nascidos pequenos, mas normalmente proporcionais, enquanto que a subnutrição no final da gestação pode ter menor efeito no peso, mas profundo efeito nas proporções do recém-nascido (Law, 1996).

Holness et al (2000) observaram alterações na homeostase de nutrientes energéticos e na pressão arterial de ratos adultos cujas mães foram submetidas a uma dieta normocalórica e hipoprotéica durante toda a gestação. Os autores também observaram que ratos adultos cujas mães foram submetidas a uma dieta com 8% de proteína durante a gestação e a lactação permaneceram menores do que o normal, mesmo depois de serem submetidos a uma dieta normocalórica e normoprotéica.

Desai et al (1996) observaram que a redução no tamanho corporal de filhotes de ratas que foram submetidas à restrição de proteínas durante a gestação e a lactação não está associada com uma redução linear no peso dos órgãos internos: o peso do pâncreas, do músculo esquelético e do fígado foi reduzido, no desmame; enquanto que o cérebro e os pulmões foram, relativamente, protegidos.

1.3.2 Impacto dos Hormônios

Fowden e Forhead (2001) e Fowden (2003) mostraram que os hormônios afetam o crescimento e a diferenciação dos tecidos *in útero* e que deficiências específicas de hormônios estão associados com tipos particulares de restrição de crescimento intra-uterino. Estudos também mostram que os hormônios agem no crescimento fetal, diretamente via expressão gênica, e indiretamente através de mudanças no crescimento da placenta, no metabolismo do feto e/ou na produção de fatores de crescimento e outros hormônios pelo tecido feto-placenta.

Os hormônios presentes na circulação fetal têm quatro fontes principais:

- 1ª) Secretados pelas glândulas endócrinas do feto. O pâncreas, a tireóide, a pituitária e a glândula adrenal do feto são funcionais no início da gestação e tornam-se progressivamente responsivos ao estímulo durante o final da gestação (Fowden e Hill, 2001).
- 2ª) Derivados dos tecidos úteros placentários. Estes tecidos produzem hormônios como os esteróides, os peptídicos e os eicosanóides, que são liberados nas circulações uterina e umbilical (Challis et al, 2001).
- 3ª) Hormônios lipofílicos, tais como os esteróides e os hormônios tireóideos que podem ser derivados da mãe por difusão transplacentária (Sibley et al, 1997).
- 4ª) Derivados de moléculas precursoras da circulação pelo metabolismo nos tecidos fetais ou placentários.

As concentrações dos hormônios na circulação fetal mudam de acordo com o seu crescimento, o seu desenvolvimento e em resposta a sua condição nutricional e a outros estímulos. Quando em um recém-nascido a termo existem aumentos e diminuições nas concentrações de hormônios específicos, que agem como sinal de maturação para o feto (Fowden e Forhead 1998). Durante o crescimento e o desenvolvimento do feto estas mudanças endócrinas ocorrem de forma dependente ou independente de seu estado nutricional e induzem mudanças permanentes na função e na morfologia do tecido em preparação para a vida extra-uterina. As mudanças nas concentrações dos hormônios que ocorrem em resposta a variações no estado

nutricional, acontecem especialmente no final da gestação quando todas as glândulas endócrinas do feto são funcionantes. Em geral, as mudanças nutricionais que reduzem a disponibilidade de nutrientes para o feto diminuem a concentração de hormônios anabólicos [por exemplo, insulina, fator I de crescimento semelhante á insulina (IGF-I)] e aumentam a concentração de hormônios catabólicos (por exemplo, cortisol, catecolamina, hormônio do crescimento), enquanto que as mudanças que aumentam o suprimento de nutrientes fetais aumentam os níveis dos hormônios anabólicos e reduzem os catabólicos na circulação fetal (Fowden e Forhead, 2001).

A combinação específica das mudanças endócrinas depende da magnitude, da duração e da natureza precisa do insulto que altera o modelo de desenvolvimento fetal. Os hormônios chave envolvidos neste processo regulatório são a insulina, os hormônios da tireóide, o fator I de crescimento semelhante à insulina e os glicocorticóides (Fowden e Forhead 2004).

1.3.2.1 Impacto dos Glicocorticóides

Os glicocorticóides têm ações durante a embriogênese, no desenvolvimento estrutural de órgãos, na maturação e na “programação” do sistema homeostático (Brown et al, 1996). Os glicocorticóides têm efeitos hipertensivos e hiperglicêmicos e a administração durante a gestação reduz o peso ao nascimento de animais e de humanos. Ambos, glicocorticóides e outros hormônios esteróides exercem efeitos permanentes das desordens metabólicas que têm sido avaliados para explicar as ligações entre eventos no início da vida e doenças na idade adulta (Lindsay et al, 1996). Assim a exposição pré-natal aumentada a quantidades excessivas de glicocorticóides pode fornecer uma ligação entre ambiente nutricional e metabolismo na vida adulta.

Durante a maior parte da gestação, os glicocorticóides de origem materna estão em baixas concentrações, pela presença na placenta da isoforma do tipo II da 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase. Esta enzima converte os glicocorticóides ativos (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) em seus metabólitos inativos (cortisona e 11-dihidrocorticosterona, respectivamente). A atividade da 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II na placenta de humanos e de ratos diminui com o aumento do tamanho da placenta e é proporcional ao peso do feto (Benediktsson et al, 1993 e Seckl et al, 1995).

Brown et al (1996) mostraram através da hibridização *in situ* que esta enzima é altamente expressa no sinciotrofoblasto do rato e acredita-se que ela mantém um gradiente de cortisol da circulação materna para a fetal. Acredita-se que a afinidade muito alta da enzima por seu substrato assegura a completa proteção dos tecidos fetais, das flutuações dos glicocorticóides maternos através da inativação do cortisol ou da corticosterona materna (Holness et al, 2000). A atividade placentária da 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II é regulada por fatores nutricionais e endócrinos (Clarke et al, 2002 e Seckl, 2001), e varia entre espécies, em paralelo com a magnitude do gradiente de concentração de cortisol materno-fetal.

Uma exposição fetal aumentada a glicocorticóides pode ocorrer devido a níveis aumentados de cortisol materno, atividade diminuída placentária da 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II ou produção aumentada de cortisol pela adrenal do feto. A importância e a contribuição relativa de cada uma destas fontes para mudar os níveis de glicocorticóides do feto varia com a idade gestacional e em resposta as condições endócrinas e nutricionais prevalentes (Fowden e Forhead 2004).

No final da gestação, quando a glândula adrenal do feto torna-se ativa, a separação da influência adrenal materna é particularmente importante para viabilizar a função independente do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal do feto (Seckl e Olsson, 1995). O glicocorticóide fetal surge, imediatamente antes do parto, como um sinal para a maturação dos órgãos, crucial para a transição da vida intra para extra-uterina.

Os glicocorticóides promovem a diferenciação e maturação de tecidos chaves incluindo o pulmão, o intestino, o fígado e o cérebro (Fowden e Forhead, 1998).

Os receptores de glicocorticóides intracelulares são expressos em muitos tecidos fetais da metade da gestação em diante (Cole et al, 1995; Kittraki et al, 1997 e Diaz et al, 1998), como o fígado e o tecido adiposo, cujas estruturas e funções na vida adulta são afetados por eventos de programação no início da vida (Seckl et al, 1999).

O aumento dos níveis de glicocorticóides no início da gestação tem mostrado acelerar a maturação daqueles tecidos essenciais para a sobrevivência imediatamente após o nascimento e também dos órgãos que estão envolvidos nas adaptações mais a longo prazo à vida extra-uterina (Liggins, 1994). Níveis de fator de liberação de corticotrofina e níveis de cortisol estão aumentados em fetos humanos com retardo no crescimento (Goland et al, 1993).

O déficit no crescimento, devido à exposição aumentada a glicocorticóides durante o início do desenvolvimento, reflete um aumento na diferenciação do tecido em relação a sua proliferação. A resultante alteração permanente na função e no número celular tem conseqüências potencialmente adversas na vida adulta (Holness et al, 2000).

Os glicocorticóides exercem um efeito importante maturacional no sistema de receptores adrenérgicos e numa variedade de enzimas metabólicas chaves. Entre estas está a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (limitante de velocidade na gliconeogênese), que é direta e potencialmente regulada pelos glicocorticóides em nível de transcrição. A exposição inicial a glicocorticóides pode programar estes sistemas por alterar permanentemente o metabolismo dos carboidratos. Os glicocorticóides podem agir indiretamente influenciando a expressão fetal ou placentária de fatores de crescimento chaves. Os glicocorticóides regulam a síntese dos fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGF-1 e 2), das proteínas de ligação dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFBPs) e ambos subtipos de receptores no feto e na placenta (Lindsay et al, 1996).

1.4 Ontogenia da Célula β

Em roedores, a massa de células β desenvolve-se em três fases. Durante a primeira fase, a fase de pró-diferenciação entre o 10° e 15° dia de vida fetal (F10-15), aparecem algumas células que contém insulina. Estas células co-expressam glucagon, mas não estão associadas dentro das ilhotas e não expressam os transportadores-2 de glicose (GLUT₂) ou moléculas associadas com grânulos secretores como o polipeptídio amilóide das ilhotas (IAPP) presentes nas células β adultas. A insulina se acumula dentro do pâncreas, paralelamente à velocidade de proliferação celular. Em torno do 15° dia de vida fetal, pela transcrição aumentada e pela subsequente velocidade aumentada da síntese de insulina, tem-se a segunda fase. Ocorre a citodiferenciação das células β , caracterizada pelo aparecimento dos grânulos secretores e pelo aumento exponencial do conteúdo hormonal por célula. Estas novas células que contém insulina não mais co-expressam glucagon. Elas são positivas para GLUT₂, expressam moléculas características associadas com as células β adultas, e estão agrupadas dentro das ilhotas. Para formar as Ilhotas de Langerhans, as células diferenciadas migram para dentro da matriz intersticial e agregam-se.

Esta morfogênese requer a degradação da matriz extracelular que ocorre em roedores entre o 17° e o 19° dia de vida fetal (F17-19) através da ativação de uma metaloproteinase, que está sob o controle de um fator β de transformação de crescimento (TGF- β). O estágio completamente diferenciado é alcançado no dia 19 para o dia 20. Esta seqüência de eventos ocorre da mesma maneira *in vivo* e *in vitro*, indicando sua autonomia (Rubenstein, A. H., 2001).

A disponibilidade de insulina durante o desenvolvimento é dependente de um aumento da massa de células β pancreáticas dentro das Ilhotas de Langerhans, que pode ser derivado de um aumento no número de células β dentro das ilhotas já existentes ou da neogênese de novas células β , como células individuais ou dentro de pequenas ilhotas (Finegood et al, 1995).

No rato em idade fetal, a área celular imunocorada para insulina aumenta duas vezes ao longo de dois dias precedentes ao nascimento, devido ao recrutamento e a replicação das células β , e a maturação dos precursores de células β não diferenciados (Hill e Hogg, 1991 e Kaung, 1994) dentro dos ductos pancreáticos. A velocidade de crescimento da população de todas as células das ilhotas, incluindo as células β , começa a diminuir no 3° e 4° dias de vida pós-natal (Kaung, 1994). A velocidade de mitose nas células β pancreáticas adultas é normalmente baixa (3% da velocidade de replicação das células β por dia) (Finegood et al, 1995; e Hellerstrom e Swenne, 1985).

1.5 Apoptose e Remodelação das Ilhotas de Langerhans Durante o Início do Desenvolvimento Pós-Natal

A ontogenia das células das ilhotas de Langerhans no início da vida do rato envolve um balanço entre a replicação e neogênese das células β , e a morte programada destas células. Uma onda transitória de apoptose ocorre em ilhotas de ratos neonatais entre a primeira e a segunda semana de vida (Finegood et al, 1995 e Scaglia et al, 1997). Nesta idade, a massa de células β não é alterada consideravelmente, sugerindo que uma nova população de células β , derivadas da replicação ou da neogênese, compensa a perda. Um processo semelhante de apoptose das células β foi descrito, recentemente, em pâncreas fetal humano no terceiro trimestre de gestação (Petrik et al, 1998).

Esta ontogenia das células β pode sinalizar a mudança de uma população adequada para a vida fetal (que não necessitam liberar insulina dentro de um ambiente nutricional estável), para as células β com um limiar alterado de glicose e também sinaliza a habilidade em liberar insulina rapidamente sob características nutricionais, endócrinas e neurais do controle metabólico adulto.

Os mecanismos que controlam a neogênese ou a apoptose das células das ilhotas durante o desenvolvimento são desconhecidos, mas eles podem estar ligados à expressão relativa dos fatores de crescimento peptídicos dentro do pâncreas em desenvolvimento. Existem consideráveis evidências de que os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são os maiores contribuintes para o crescimento, a maturação e a função das células β (Petrik et al, 1998). O mRNA para o IGF-II é abundante no pâncreas de feto de ratos e diminui rapidamente nas duas primeiras semanas após o nascimento, enquanto que a expressão do mRNA para IGF-I é baixa no feto, mas aumenta para níveis adultos perto do desmame (Hogg et al, 1994). Os IGFs são expressos pelas células β por toda a vida e suas ações podem ser moduladas pelas proteínas de ligação dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFBPs) produzida localmente (Petrik et al, 1998).

Ilhotas isoladas de feto, de neonatos humanos, e de ratos liberam IGF-I e/ou IGF-II, que são capazes de aumentar a síntese de ácido deoxiribonucleico (DNA) nas células das ilhotas. A ação mitogênica do IGF-II em ilhotas isoladas de feto de ratos foi potencializada pelas IGFBPs-1

e -2, que juntas com outras IGFbps são expressas pelas ilhotas. Os IGF-I e -II também podem rapidamente modular a liberação de insulina de ilhotas de ratos adultos de uma maneira bifásica.

Os mecanismos pelo qual os IGFs são capazes de proteger as células da apoptose induzida, são desconhecidos. No entanto, o IGF-I parece inibir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em alguns tipos de tecidos, tais como o músculo liso vascular, assim poderia interferir com a síntese de óxido nítrico estimulada pelas citocinas (Hill et al, 1999).

Uma replicação diminuída e uma incidência aumentada de apoptose nas células β pancreáticas é observada entre 1 e 2 semanas de vida pós-natal em ratos normonutridos. Tem sido sugerido que a apoptose pode ser um importante mecanismo na remodelação da massa de células β durante o início do desenvolvimento pós-natal. Uma alteração deste processo poderia ser de grande importância durante este período de tempo, quando o balanço entre a replicação e a morte celular determina o desenvolvimento da massa de células β pancreáticas (Scaglia et al, 1997). O período de onda transitória de apoptose, no rato, está associado com uma perda de expressão do IGF-II nas ilhotas pancreáticas (Petrik et al, 1998). O número de células apoptóticas está aumentado em ilhotas pancreáticas de animais com retardo de crescimento induzido por uma dieta hipoprotéica, enquanto que o número de células positivas para o IGF-II está diminuído (Mune et al, 1995).

A restrição de crescimento intra-uterino em humanos, e um retardo de crescimento induzido experimentalmente em feto de rato, estão associados com a redução dos IGFs e uma presença alterada das IGFbps na circulação. Hogg et al, 1993 e Massa et al, 1997 mostraram que aminoácidos e/ou glicose aumentam a liberação de IGFs-I e II e de IGFbps-1 e -2 em ilhotas isoladas de pâncreas de feto de rato ou de hamster adulto.

1.6 Alterações Causadas por um Ambiente Nutricional Inadequado em Períodos Críticos do Crescimento e do Desenvolvimento Fetal e Início do Pós-Natal

Os resultados descritos a baixo são de modelos experimentais de ratos com 21 dias de idade; e três, cinco, onze e quinze meses de idade que foram submetidos a uma dieta normocalórica com 8% de proteína durante a vida fetal e lactacional e após o desmame foram alimentados com uma dieta normocalórica e normoprotéica (ratos desnutridos).

- I. Ratos desnutridos, com 3 meses de idade, foram mais tolerantes à glicose em relação aos ratos normonutridos. Um prejuízo na tolerância à glicose é vista em animais normonutridos e desnutridos com o envelhecimento. No entanto, este prejuízo é muito mais pronunciado nos filhotes que foram submetidos à restrição de crescimento intra-uterino, tal que aos 15 meses de idade estes animais são significativamente mais intolerantes à glicose (Hales et al, 1996). Estes resultados sugerem que a desnutrição protéica no período de crescimento fetal e no início do pós-natal é crítica para a tolerância à glicose na vida adulta após 1 ano de idade.
- II. A tolerância à glicose dos ratos desnutridos, com 3 meses de idade, foi melhor do que a do grupo normonutrido. Possivelmente isto foi devido à sensibilidade à insulina aumentada, uma vez que as concentrações de insulina plasmáticas foram reduzidas (Shepherd et al, 1997). No entanto, com a idade a tolerância à glicose destes animais deteriora-se mais rapidamente (Hales et al, 1996) e posteriormente desenvolvem DM II (Petry et al, 2001). A base do mecanismo desta perda de tolerância à glicose, dependente da idade, ainda é desconhecida. No entanto, em ratos machos desnutridos isto parece resultar da resistência à insulina, visto que as concentrações de insulina foram maiores, enquanto que em fêmeas parece resultar da deficiência de insulina (Hales et al, 1996). Existem algumas evidências de que o processo de aumento da resistência à insulina possa ser acelerado pela introdução de uma dieta rica em lipídeos (Wilson e Hughes, 1997; Holness e Sugden, 1996).

- III. Desai et al (1997) mostraram que a atividade da enzima glicolítica glicoquinase foi significativamente reduzida em ratos desnutridos com 3 meses de idade. A atividade da enzima gliconeogênica fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) destes animais foi significativamente aumentada em relação aos ratos normonutridos.
- IV. Desai et al (1997) mostraram que o peso corporal de ratos desnutridos, com 11 meses de idade, permaneceu significativamente reduzido. No entanto, o peso do fígado destes animais não foi diferente do grupo normonutrido. A recuperação no tamanho do fígado não necessariamente indica uma normalização da função hepática: uma atividade diminuída da glicoquinase foi observada nas duas idades (21 dias e 11 meses) deste grupo em relação ao grupo normonutrido. Enquanto que a atividade da PEPCK estava significativamente aumentada, em ambas idades, no grupo que sofreu uma restrição de crescimento intra-uterino. Os autores também acharam um aumento de 88% na expressão do mRNA da PEPCK e uma diminuição de 54% na expressão do mRNA da glicoquinase deste grupo.
- V. Ratos desnutridos, com 3 meses de idade, apresentaram 3 vezes mais receptores de insulina e 5 vezes menos receptores de glucagon na membrana dos hepatócitos. Estes animais apresentaram uma internalização aumentada de insulina dentro dos endossomas dos hepatócitos e uma resistência do fígado aos efeitos do glucagon em estimular a produção de glicose, talvez pelas alterações dos números de receptores tanto de insulina como de glucagon observadas (Ozanne et al, 1996_a).
- VI. Desai et al (1996) mostraram que filhotes de ratas que foram submetidas a uma dieta com 8% de proteína durante a gestação nasceram significativamente menores tais que dois dias depois do nascimento eles pesaram cerca de 15 a 20% menos do que o grupo normoprotéico. Diferenças nos pesos entre os dois grupos de filhotes aumentaram se a mãe continuou a ser alimentada com um ração restrita em proteínas.
- VII. O tecido muscular esquelético é considerado o maior sítio de captação de glicose pós-prandial (DeFronzo et al, 1992). Ozanne et al (1996_b) mostraram haver o dobro de receptores de insulina por miligrama de proteína muscular em ratos

desnutridos com 3 meses de idade. O músculo tibial anterior deste grupo apresentou uma velocidade no transporte de glicose basal e em presença de 300 pM de insulina maior em relação ao grupo normonutrido. No entanto, quando incubado com altas concentrações de insulina (16 nM) a velocidade de transporte de glicose no grupo desnutrido teve apenas um aumento de 50% em relação à velocidade no transporte de glicose basal.

- VIII. Em ratos desnutridos, com 3 meses de idade, não se observou diferença no conteúdo de GLUT-4, entretanto, a distribuição sub celular de GLUT-4 foi 1:1,3 (membrana plasmática/membrana intracelular) no grupo desnutrido, e 1:6,6 no grupo normonutrido. Esta diferença na distribuição sub celular de GLUT-4 do grupo desnutrido pode estar relacionado à sua aumentada sensibilidade à insulina, contribuindo para melhor tolerância à glicose nesta idade. Estas mudanças na ação da insulina foram revertidas com a idade (Ozanne et al, 1996_b).
- IX. Ozanne et al (2000_b) mostraram que a ação da insulina na captação de glicose foi significativamente diminuída em ratos desnutridos, com 15 meses de idade, em relação aos ratos normonutridos.
- X. Adipócitos isolados de ratos desnutridos, com 3 meses de idade, tiveram maior captação basal de glicose e sob condições de máxima estimulação de insulina, em relação aos ratos normonutridos (Ozanne et al, 1997).
- XI. Ozanne et al (2000_a) mostraram maior captação basal de glicose em adipócitos do epidídimo, intra-abdominal e subcutâneo em ratos desnutridos com 3 meses de idade. Estes tecidos também apresentaram maior quantidade de receptores de insulina, em relação ao grupo normonutrido.
- XII. Holness e Sugden (1999) mostraram por estudos *in vivo* que adipócitos isolados de ratos desnutridos, com 5 meses de idade, exibiram utilização aumentada de glicose em resposta a hiperinsulinemia, apesar de uma utilização de glicose basal menor. Observou-se, também, por estudos *in vitro* que os adipócitos isolados destes animais apresentaram captação aumentada de glicose em altas concentrações de insulina, mas uma resposta reduzida a concentrações fisiológicas de insulina. Isto sugere que a partir de um determinado momento, estes animais se tornarão

deficientes em insulina, em consequência ocorrerá um aumento da glicemia, tanto pela resistência à insulina ou pela deficiência de insulina Holness e Sugden (1996).

A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é uma enzima heterodimérica que consiste de uma subunidade regulatória e uma subunidade catalítica (Shepherd et al, 1998). A ativação da PI3K pela interação da subunidade regulatória com o substrato-1 receptor de insulina (IRS-1) fosforilado é necessário para que a insulina estimule a captação de glicose. Existem pelo menos duas isoformas da subunidade catalítica nos adipócitos: a p110 α e a p100 β (Hiles et al, 1992 e Hu et al, 1993). A função precisa de cada uma destas subunidades e a atividade relativa de cada uma não estão completamente esclarecidas.

- XIII. Ozanne et al (1997) mostraram que a PI3K estava mais ativa nos adipócitos de ratos desnutridos com 3 meses de idade. O IRS-1 associado à atividade da PI3K apresentou níveis elevados nos adipócitos destes animais em condições basais e estimulada por insulina. No entanto, estes ratos apresentaram uma diminuição na expressão da subunidade catalítica p100 β da PI3K nos adipócitos. Shepherd et al (1998) têm observado em seus trabalhos que a PI3K é essencial para a mediação de numerosas ações metabólicas da insulina, incluindo a estimulação da captação da glicose e inibição da lipólise. A lipólise estimulada por isoproterenol em adipócitos de ratos desnutridos foi maior em relação aos ratos normonutridos. A insulina (em concentração máxima, 100 nM) teve um efeito notavelmente reduzido na velocidade lipolítica nos adipócitos destes animais (Ozanne et al, 1999). A inibição da lipólise só foi observada em adipócitos intra-abdominais (Ozanne et al, 2000_a).
- XIV. Petry et al (2000) mostraram um aumento na expressão dos receptores adrenérgicos β_1 e β_3 em adipócitos do epidídimo de ratos desnutridos com 3 meses de idade. Diferenças semelhantes na expressão destes receptores foram observadas nos adipócitos intra-abdominal e subcutâneo. No estado alimentado, o grupo desnutrido teve maiores concentrações plasmáticas tanto de adrenalina como de

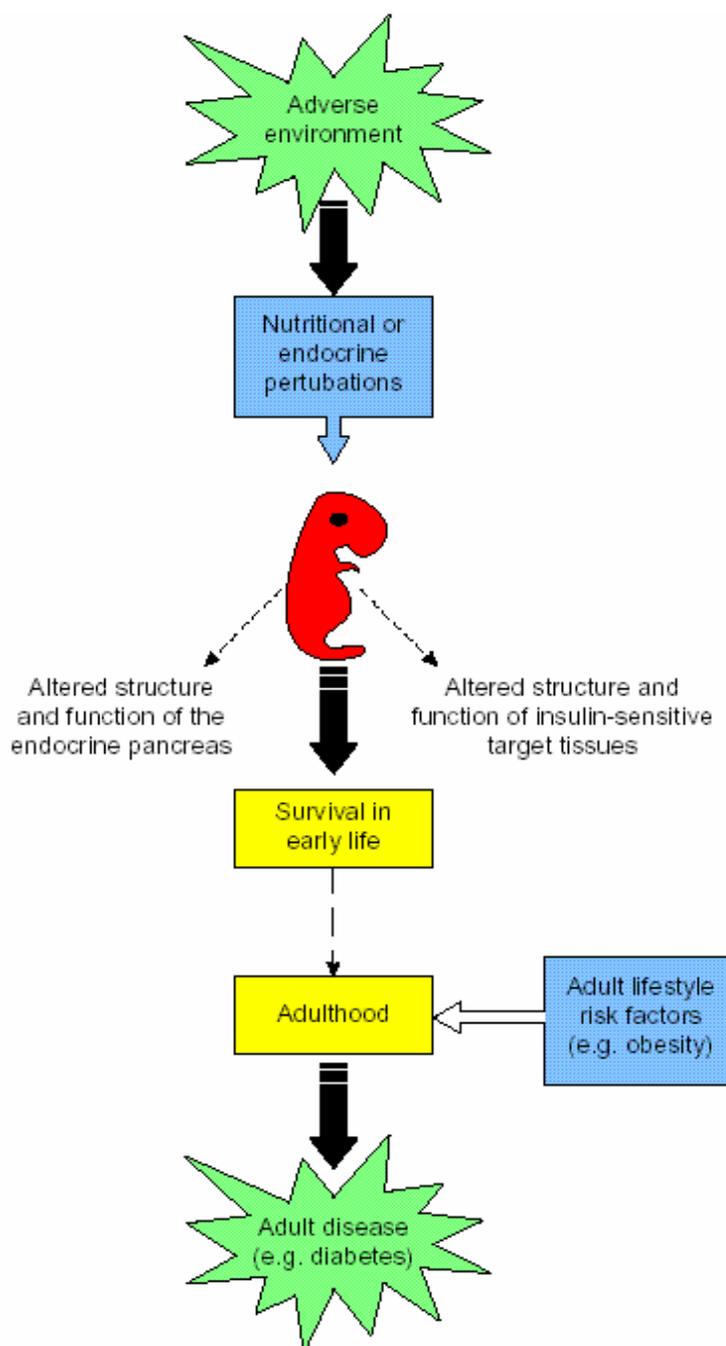
noradrenalina. Depois de 24 horas de jejum, a diferença entre os dois grupos desapareceu. A semelhança nas concentrações de catecolaminas no estado alimentado e jejum dos ratos desnutridos aumenta a possibilidade de que o metabolismo destes animais opera de maneira quase de inanição mesmo quando eles são adequadamente nutridos, o que é consistente com a hipótese do fenótipo econômico (Hales e Barker em 1992).

Recentemente, Maison et al (2000) mostraram que o tratamento com antagonistas β adrenérgicos preveniu um aumento na concentração de ácidos graxos não esterificados circulantes observado ao longo de quatro anos e meio em pacientes com HAS que foram tratados com diuréticos.

- XV. Snoeck et al (1990) mostraram que a proliferação das células β , o tamanho e a vascularização das ilhotas foram diminuídos na cabeça do pâncreas de neonatos cujas mães que receberam uma dieta hipoprotéica.
- XVI. Berney et al (1997) verificaram que a média do logaritmo da área das ilhotas de ratos desnutridos, com 21 dias de idade, foram maiores. O grupo desnutrido mostrou maior irregularidade na forma das ilhotas e menor na quantidade de ilhotas. A relação de células β /células α foi de 5:1 para o grupo desnutrido e 9:1 para o grupo controle. O peso corporal, o peso pancreático, o peso das ilhotas, o peso das células β e a relação do peso das células β /peso corporal do grupo desnutrido foram menores. No entanto, um defeito na secreção de insulina estimulada por glicose de ilhotas de ratos desnutridos adultos somente é observado quando um insulto dietético adicional, como uma dieta rica em lipídeos ou em sacarose é oferecida pós-natal (Wilson e Hughes, 1997).

A secreção prejudicada de insulina e a ação reduzida da insulina contribuem para a patogênese do DM II (Reaven et al, 1976). O grau de desequilíbrio do controle glicoregulatório varia em função da magnitude da perda da ação da insulina, *in vivo*, em relação à capacidade das células β em compensar este defeito pela hipersecreção de insulina (Reaven 1995).

Estudos prévios mostram que o insulto provocado pela restrição protéica durante o período fetal e lactacional aumenta a ação da insulina apesar de sua secreção prejudicada, mantendo assim uma tolerância normal à glicose. Mas, a ingestão de uma dieta hiperlipídica leva a um pequeno prejuízo na ação periférica da insulina sem afetar a tolerância a glicose, em consequência do aumento de secreção de insulina (Holness, 1996). No entanto, a exposição crônica das duas intervenções dietéticas resulta em uma interação sinérgica, levando a um importante prejuízo na ação periférica da insulina em combinação com uma diminuição da secreção da mesma, resultando em uma intolerância a glicose [(figura 1) Holness et al, 2000].



Fonte: Holness, M. J. et al (2000)

Figura 1: Representação Esquemática da Influência de Eventos em Períodos Críticos do Crescimento e do Desenvolvimento na Progressão de Doenças Metabólicas na Vida Adulta.

O genótipo econômico, discutido por Nell (1962), considera a noção de que a seleção gênica durante os anos da evolução humana, provavelmente, foi influenciada pela atividade física para a manutenção da saúde. Como nossos ancestrais, no final da era paleolítica, eram submetidos a períodos de abundância de alimentos misturados com períodos de fome e períodos de extrema atividade física misturados com períodos de repouso, a atividade física foi obrigatoriamente requerida para a procura de alimentos, necessária para a sobrevivência de nossa espécie (Chakravarthy, 2004). Assim, a combinação da oferta contínua de alimentos associada ao estilo de vida sedentário, muito observado nos dias de hoje, resulta em um desequilíbrio metabólico, contribuindo para as doenças crônicas como o DM II.

O presente estudo envolve análises separadas dos efeitos de duas intervenções dietéticas conhecidas sobre a secreção de insulina (restrição de proteínas) ou em relação à ação da insulina (alimentação hiperlipídica).

1.7 Objetivos

Verificar os efeitos: (i) da desnutrição pré-gestacional, gestacional e lactacional sobre o metabolismo de carboidratos em ratas com 2 meses de idade; (ii) da desnutrição gestacional e lactacional associada à exposição crônica à dieta hiperlipídica sobre o metabolismo de carboidratos e de lipídeos em ratas com 4 e 8 meses de idade; e (iii) da desnutrição crônica gestacional, lactacional até os 4 meses de idade sobre o metabolismo de carboidratos e de lipídeos, em ratas.

Para alcançar os objetivos propostos serão avaliados os seguintes parâmetros:

1.7.2.1 O peso corporal (curva de crescimento);

1.7.2.2 O consumo de ração;

1.7.2.3 A relação peso do fígado/100 g massa corporal;

1.7.2.4 A relação tecido adiposo total e visceral/100 g massa corporal;

1.7.2.5 A incorporação *in vitro* de Glicose Proveniente de D-[U-¹⁴C]-Frutose, de L-[U-¹⁴C]-Glicerol e de D-[U-¹⁴C]-Glicose ao Glicogênio Hepático;

1.7.2.6 A concentração Hepática de Glicogênio;

1.7.2.7 A captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo

1.7.2.8 A concentração Hepática de Triglicerídeos;

1.7.2.9 O Teste de Sensibilidade à insulina;

1.7.2.10 O Teste de Tolerância à glicose;

1.7.2.11 A concentração plasmática de: triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol, lipídeos totais, glicose e albumina;

1.7.2.12 A atividade plasmática das enzimas lipase, amilase e fosfatase alcalina.

MATERIAIS E MÉTODOS:

2.1 Material

2.1.1 Reagentes:

D-[U-¹⁴C]-Deoxiglicose: atividade específica 308 mCi/mmol (Amersham)

D-[U-¹⁴C]-Frutose: atividade específica 321 mCi/mmol (Amersham)

D-[U-¹⁴C]-Glicerol: atividade específica 157 mCi/mmol (Amersham)

L-[U-¹⁴C]-Glicose: atividade específica 297 mCi/mmol (Amersham)

Caseína p.a., 84% de pureza: Alquímica

Fibras (Microcelulose cristalina): Blanver Farmoquímica Ltda.

Glicogênio: Sigma Chemical Co

Kit Glicose PAP Liquiform (glicose oxidase): Labtest Diagnóstica

Kit Triglicérides GPO-ANA: Labtest Diagnóstica

Mistura Vitamínica: Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.

POPOP e PPO: Sigma Chemical Co

Proteína Isolada de Soja p.a., 92 % de pureza: BUNGE Alimentos

2.1.2 Obtenção do Soro:

Os animais foram sacrificados por decapitação. Colheu-se o sangue em tubos de ensaio (de vidro), estes foram imediatamente centrifugados a 2000 rpm/10 minutos, e colocados em gelo. Alíquotas de soro foram retiradas e colocadas em tubos Eppendorf, armazenados a uma temperatura de - 20°C para posteriores determinações.

2.1.3 Análise do Soro:

A análise Bioquímica foi realizada em Multi-test Analyzer (Mega, Merck, Darmstadt, Germany) por usar kits específicos obtidos pela Merck:

- Glicose (GLUC-DH 1.07116-0001);
- Albumina (SMT, 1.19722.0001, bromocresol method);
- Triglicerídeos (SMT-triglycerides, 1.19706.0001, GPO-PAP method);
- Colesterol-SMT 1.19738.0001, CHOD-(PAP method);
- LDL colesterol (1.14992.0001, CHOD-PAP method).
- Lipoproteína de alta densidade foi determinada usando um kit (HDL cholesterol direct FS) do DiaSys (Diagnostic Systems International, Holzheim, Germany).

Todos os demais reagentes e solventes foram de pureza “pró-análise”, (p.a.), adquiridos de Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA), Merck e Reagen.

2.1.4 Animais Experimentais:

Foram utilizadas ratas Wistar, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Rio Grande do Sul.

O tamanho da ninhada foi ajustado em oito filhotes por mãe após o 1º dia de vida pós-natal e os filhotes foram desmamados aos 21 dias de idade. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, com ciclo de luminosidade claro-escuro de 12 horas (luz: 7h – 19h). O protocolo utilizado foi de acordo com as normas do Comitê de Cuidados e Uso em Pesquisa de Animal Experimental, Escola de Medicina Veterinária e Ciência Animal da Universidade de São Paulo, Brasil.

2.2 Métodos:

2.2.1 Modelos de Desnutrição e Modelo de Obesidade:

Foram utilizadas três modelos de desnutrição: desnutrição pré-gestacional, gestacional e lactacional; desnutrição gestacional e lactacional e desnutrição crônica (gestacional, lactacional e até a idade adulta), segundo Morgane (2002). O modelo de obesidade foi o descrito por Holness e Sugden (2001). Os animais experimentais receberam água e dieta “*ad libitum*”.

2.2.2 Grupos Experimentais:

Para melhor entendimento denominamos os diferentes grupos dessa forma:

Hipoprotéico e Normolipídico: as ratas mães foram submetidas à dieta hipoprotéica com 7% de proteína (caseína) e 15% de lipídio (óleo de soja), iniciando 05 semanas antes do acasalamento, durante a gestação e lactação. Os filhotes continuaram com a mesma ração até completar dois meses de idade.

Normoprotéico e Normolipídico: os animais receberam dieta isocalórica com 25% de proteína (caseína) e 15% de lipídio (óleo de soja) durante o período gestacional e lactacional. Os filhotes continuaram com a mesma ração até completarem dois meses de idade.

Desnutrido: os animais receberam dieta isocalórica com 7% de proteína (proteína isolada de soja) e 10% de lipídio (óleo de soja) durante os períodos gestacional e lactacional e até completarem a idade experimental de 4 meses de idade;

Normonutrido: os animais receberam dieta isocalórica com 25% de proteína (proteína isolada de soja) e 10% de lipídio (óleo de soja) durante os períodos gestacional e lactacional e até completarem a idade experimental de 4 meses de idade;

Dieta Comercial: os animais receberam dieta comercial Nuvilab® desde o acasalamento dos progenitores até a idade experimental de 4 e 8 meses de idade;

Hipoprotéico e Hiperlipídico: as ratas mães receberam dieta isocalórica com 7% de proteína (proteína isolada de soja) e 15% de lipídio (óleo de soja) durante o período gestacional e lactacional; os filhotes receberam uma dieta hipercalórica com 25% de proteína (proteína isolada de soja) e 42% de lipídio (2% de óleo de soja e 40% banha de porco) do desmame até completarem a idade experimental de 4 e 8 meses de idade;

Normoprotéico e Hiperlipídico: as ratas mães receberam dieta isocalórica com 25% de proteína (proteína isolada de soja) e 15% de lipídio (óleo de soja) durante o período gestacional e lactacional; os filhotes receberam uma dieta hipercalórica com 25% de proteína (proteína isolada de soja) e 42% de lipídio (2% de óleo de soja e 40% banha de porco) do desmame até a idade experimental de 4 e 8 meses de idade.

2.2.3 Dietas:

Componentes	25%	7%	25%	7%
Proteína (isolada de soja)	27,20	7,60	27,20	7,60
Mistura salina¹	4,00	4,00	4,00	4,00
Mistura Vitamínica²	1,00	1,00	1,00	1,00
Fibras	1,00	1,00	1,00	1,00
Óleo de soja	10,00	10,00	15,00	15,00
DL-metionina	0,30	0,30	0,30	0,30
Amido de milho	56,50	76,10	51,50	71,10

Densidade Calórica das dietas com 10% e 15% de lipídeos, respectivamente: 4.25 e 4.50 kcal/g.

1 – Composição (mg/100g de ração): NaCl, 557; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄ . 7H₂O, 108; MnSO₄ . H₂O, 16; ZnSO₄ . 7H₂O, 2,2; CuSO₄ . 5H₂O, 1,9; CoCl . 6H₂O, 0,009; KI, 3,2.

2 – Composição (mg ou UI/100g de ração): Vitamina A, 2000 UI; Vitamina D, 2000 UI; Vitamina E, 10 UI; Menadiona, 0,50 mg; Colina, 200,00 mg; Ác. p-amino-benzóico, 10,00 mg; Inositol, 10,00 mg; Niacina, 4,00 mg; Ca-D-pantotenato, 4,00 mg; Riboflavina, 0,80 mg; Tiamina, 0,50 mg; Piridoxina HCl, 0,50 mg; Ác. Fólico, 0,20 mg; Biotina, 0,04 mg; Vitamina B12, 0,003 mg.

1 e 2 – Segundo Métodos Oficiais de Análises da Associação de Química Analítica (AOAC); Horwitz, 1980.

**TABELA 2: Composição das Dietas com Caseína
como Fonte Protéica (g/100g de dieta)**

Componentes	25%	7%
Proteína (caseína)	28,70	8,00
Mistura salina¹	4,00	4,00
Mistura Vitamínica²	1,00	1,00
Fibras	1,00	1,00
Óleo de soja	15,00	15,00
DL-metionina	0,30	0,30
Amido de milho	50,00	70,70

Densidade Calórica da dieta: 4,50 kcal/g.

1 – Composição (mg/100g de ração): NaCl, 557; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄ . 7H₂O, 108; MnSO₄ . H₂O, 16; ZnSO₄ . 7H₂O, 2,2; CuSO₄ . 5H₂O, 1,9; CoCl . 6H₂O, 0,009; KI, 3,2.

2 – Composição (mg ou UI/100g de ração): Vitamina A, 2000 UI; Vitamina D, 2000 UI; Vitamina E, 10 UI; Menadiona, 0,50 mg; Colina, 200,00 mg; Ác. p-amino-benzóico, 10,00 mg; Inositol, 10,00 mg; Niacina, 4,00 mg; Ca-D-pantotenato, 4,00 mg; Riboflavina, 0,80 mg; Tiamina, 0,50 mg; Piridoxina HCl, 0,50 mg; Ác. Fólico, 0,20 mg; Biotina, 0,04 mg; Vitamina B12, 0,003 mg.

1 e 2 – Segundo Métodos Oficiais de Análises da Associação de Química Analítica (AOAC); Horwitz, 1980.

TABELA 3: Composição da Dieta Hipercalórica (g/100g de dieta)

Componentes	25%
Proteína (isolada de soja)	27,20
Mistura salina¹	4,00
Mistura Vitamínica²	1,00
Fibras	1,00
Óleo de soja	2,00
Banha de porco	40,00
DL-metionina	0,30
Sacarose	12,25
Amido de milho	12,25

Densidade Calórica da dieta: 5.85 kcal/g.

1 – Composição (mg/100g de ração): NaCl, 557; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄ . 7H₂O, 108; MnSO₄ . H₂O, 16; ZnSO₄ . 7H₂O, 2,2; CuSO₄ . 5H₂O, 1,9; CoCl . 6H₂O, 0,009; KI, 3,2.

2 – Composição (mg ou UI/100g de ração): Vitamina A, 2000 UI; Vitamina D, 2000 UI; Vitamina E, 10 UI; Menadiona, 0,50 mg; Colina, 200,00 mg; Ác. p-amino-benzóico, 10,00 mg; Inositol, 10,00 mg; Niacina, 4,00 mg; Ca-D-pantotenato, 4,00 mg; Riboflavina, 0,80 mg; Tiamina, 0,50 mg; Piridoxina HCl, 0,50 mg; Ác. Fólico, 0,20 mg; Biotina, 0,04 mg; Vitamina B12, 0,003 mg.

1 e 2 – Segundo Métodos Oficiais de Análises da Associação de Química Analítica (AOAC); Horwitz, 1980.

TABELA 4: Composição da Dieta Comercial

Componentes	%
Umidade	12,50%
Proteína Bruta	22,00%
Extrato Etéreo	4,0%
Material Mineral²	10,00%
Matéria Fibrosa	8,00%
Cálcio	1,40%
Fósforo	0,80%

1 – Composição Básica do Produto: carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácido.

2 – Microelementos Minerais (Kg de ração): ferro, 50,00 mg; zinco, 60,00 mg; cobre, 10,00 mg; iodo, 2,00 mg; manganês, 60,00 mg; selênio, 0,05 mg; colina, 1,50 mg.

3 – Vitaminas (kg de ração): Vitamina A, 12.000 UI; Vitamina D₃, 1.800 UI; Vitamina E, 30,00 mg; Vitamina K₃, 3,00 mg; Vitamina B₁, 5,00 mg; Vitamina B₂, 6,00 mg; Vitamina B₆, 7,00 mg; Vitamina B₁₂, 20,00 mcg; niacina, 60,00 mg; ácido pantotênico, 20,00 mg; ácido fólico, 1,00 mg; biotina, 0,05 mg; colina, 600,00 mg.

4 – Aminoácidos (Kg de ração): DL-metionina, 300,00 mg; lisina, 100,00 mg.

5 – Aditivos (Kg ração): antioxidante, 100,00 mg.

1, 2, 3, 4 e 5 – Segundo Recomendações do National Research Council e National Institute of Health - USA.

2.2.4 Parâmetros Analisados:

2.2.4.1 Teste de Resistência à Insulina

Após jejum de oito horas, injetou-se insulina i.p. 0,75 mU/kg de peso corporal, nas ratas com quatro meses de idade e 1,00 mU/kg de peso corporal, nas ratas com oito meses de idade. Colheu-se sangue da veia caudal nos tempos zero, trinta, sessenta e cento e vinte minutos. As amostras foram imediatamente centrifugadas em tubos a 2000 rpm/10 minutos, o plasma separado e colocado em gelo. Alíquotas de plasma foram retiradas para determinação da glicemia através do método da glicose oxidase.

2.2.4.2 Teste de Tolerância à Glicose

Após o jejum de oito horas, injetou-se i.p., 2 mg/g de peso corporal, de uma solução de glicose 40%. Colheu-se sangue da veia caudal nos tempos zero, trinta, sessenta e cento e vinte minutos, as amostras foram imediatamente centrifugadas em tubos a 2000 rpm/10 minutos, o plasma separado e colocado em gelo. Alíquotas de plasma foram retiradas para determinação da glicemia através do método da glicose oxidase.

2.2.4.3 Modelo Experimental de Incorporação *in vitro* de Glicose Proveniente de D-[U-¹⁴C]-Frutose, de L-[U-¹⁴C]-Glicerol e de D-[U-¹⁴C]-Glicose ao Glicogênio Hepático

O fígado dos animais experimentais foi retirado e imediatamente colocado sobre papel filtro embebido em solução Krebs-Ringer bicarbonato, sobre placa de Petri, no gelo. Pedacos de tecido hepático entre 80 e 100 mg foram fatiados no Mc Ilwain Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co LTDA) a uma espessura de 300 µm. As fatias foram incubadas em: (i) 1,0 mL de tampão Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4 e 5 mM glicose + 5 mM Frutose + 0,2 µCi D-[U-¹⁴C]-Frutose; (ii) 1,0 mL de tampão Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4 e 10 mM glicose + 0,2 µCi D-[U-¹⁴C]-Glicose; (iii) 1,0 mL de tampão Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4 e 5 mM glicose + 1 mM Glicerol + 0,2 µCi L-[U-¹⁴C]-Glicerol. O experimento foi realizado em

atmosfera de carbogênio (95% O₂ / 5% CO₂), sob agitação e temperatura de 37°C (Dubnoff). Após 30 minutos, a reação foi interrompida colocando os béqueres em gelo e adicionando 1,0 mL de KOH (60%). O conteúdo dos béqueres foi transferido para tubos de ensaio e os béqueres foram lavados com 0,5 mL de KOH 30% (este volume adicionado aos tubos). Os tubos foram colocados em banho fervente (100°C) por 20 minutos ou até homogeneizar o tecido. Após esfriar, se adicionou 3,8 mL de etanol 99 °G. L. Esta mistura foi colocada em banho maria a 70°C/10 minutos e após, em gelo por 15 minutos, onde ocorreu a precipitação do glicogênio. Os tubos foram centrifugados a 2000 rpm/10 minutos e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi suspenso com 0,3 mL de água de Milli Q e transferido para “vials” de plástico. Os tubos foram lavados com 0,3 mL de água de Milli Q e este volume transferido aos “vials”. Adicionou-se 1,7 mL de etanol 95°G.L. nos “vials” e estes foram resfriados em gelo por 20 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado por 10 minutos/2000 rpm e o sobrenadante desprezado. Adicionou-se 0,2 mL de água de Milli Q e líquido de cintilação. A radioatividade incorporada foi medida em um contador de cintilação líquida (Wallac 1409).

2.2.4.4 Determinação da Concentração Hepática de Glicogênio

Após a pesagem, o fígado foi colocado em tubos de ensaio (capacidade de 10 mL) contendo KOH 30% na proporção de 100 mg de tecido para 1,0 mL de KOH 30%. Os tubos foram colocados em banho maria fervente por 20 minutos ou até homogeneizar o tecido. Após esfriar, se adicionou 2,5 mL de etanol 95° G.L. Esta mistura foi colocada em banho maria a 70°C, por 10 minutos e, após, em gelo por 15 minutos, onde ocorreu a precipitação de glicogênio. Após centrifugação (2000 rpm/10 minutos) o sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se 1,0 mL de água de Milli Q ao precipitado.

Para determinação da concentração de glicogênio hepático, realizamos a reação colorimétrica, segundo método de KRISMAN (1962), medida em espectrofotômetro Beckman DU 640.

2.2.4.5 Determinação da Concentração Hepática de Triglicerídeos

Após a pesagem, o fígado foi homogeneizado 1:20 (p:v) com solução salina 0,9%. Alíquotas de homogeneizado foram retiradas para determinação da concentração de triglicerídeos através do método Enzimático-Trinder.

2.2.4.6 Modelo Experimental de Captação de D-[U-¹⁴C]-Deoxiglicose em Fatias de Músculo Sóleo

O músculo sóleo foi retirado e imediatamente colocado sobre papel filtro embebido em solução Krebs-Ringer bicarbonato (KRb), sobre placa de Petri, a 4°C. Fatias de músculo sóleo entre 40 e 55 mg foram incubadas para medir a captação de D-[U-¹⁴C]-Deoxiglicose, utilizou-se um meio de incubação contendo: 1,0 mL de KRb, pH 7,4, 5 mM glicose e D-[U-¹⁴C]-Deoxiglicose. O experimento foi realizado em atmosfera de carbogênio (95% O₂ / 5% CO₂), sob agitação e temperatura de 37°C (Dubnoff). Após 30 minutos, a reação foi interrompida colocando os béqueres em gelo. Retirou-se o meio de incubação e as fatias foram lavadas com 1,0 mL de solução KRb gelada, por três vezes. Transferiu-se as fatias e o meio de lavagem para tubos Eppendorf que foi centrifugado a 2000 rpm/10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, e adicionou-se 0,2 mL de NaOH 2N e, após homogeneização do tecido, líquido de cintilação. A radioatividade incorporada foi medida em um contador de cintilação líquida (Wallac 1409).

2.2.5 Análises Estatísticas:

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test t de Student (para comparação entre idades). Todas as análises foram realizadas usando o programa SPSS, versão 10 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTADOS

Avaliamos os efeitos: (i) da desnutrição pré-gestacional, gestacional e lactacional sobre o metabolismo de carboidratos em ratas com 2 meses de idade; (ii) da desnutrição gestacional e lactacional associada a exposição crônica a dieta hiperlipídica sobre o metabolismo de carboidratos e de lipídeos em ratas com 4 e 8 meses de idade; e (iii) da desnutrição crônica desde o período gestacional até os 4 meses de idade sobre o metabolismo de carboidratos e de lipídeos em ratas.

Os parâmetros avaliados neste trabalho foram:

- Peso corporal (curva de crescimento);
- Consumo de ração
- Relação peso do fígado/100 g massa corporal;
- Relação tecido adiposo total e visceral/100 g massa corporal;
- Concentração e Síntese Hepática de glicogênio;
- Captação de 2-Deoxiglicose em fatias de músculo sóleo;
- Teste de Sensibilidade à insulina;
- Teste de Tolerância à glicose;
- Concentração Plasmática de: triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol, lipídeos totais, glicose e albumina;
- Concentração Hepática de triglicerídeos;
- Atividade Enzimática da Amilase, Lipase e Fosfatase Alcalina.

EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PRÉ-GESTACIONAL, GESTACIONAL E LACTACIONAL SOBRE O METABOLISMO HEPÁTICO DE CARBOIDRATOS EM RATAS COM 2 MESES DE IDADE.

Como pode ser observado (Tab. 5) a concentração hepática de glicogênio e a síntese hepática de glicogênio a partir de [U-¹⁴C]-frutose e de [U-¹⁴C]-glicerol foram maiores no grupo Hipoprotéico Normolipídico em relação ao grupo Normoprotéico Normolipídico.

Tabela 5: Concentração Hepática de Glicogênio e Incorporação *In Vitro* de Glicose Proveniente de [U-¹⁴C]-Frutose, de [U-¹⁴C]-Glicerol e de [U-¹⁴C]-Glicose ao Glicogênio Hepático.

Dietas	Concentração Glicogênio	Síntese Glicogênio		
		Frutose	Glicerol	Glicose
Normoprotéico (caseína) Normolipídico	5,81 ± 0,4	235 ± 5,8	12,06 ± 1,4	258,00 ± 13,3
Hipoprotéico (caseína) Normolipídico	10,55 ± 0,6 ^a	278 ± 7,5 ^a	24,08 ± 2,7 ^a	236,28 ± 14,3

As concentrações de glicogênio foram expressas em mg% e a síntese de glicogênio a partir [U-¹⁴C]-Frutose, [U-¹⁴C]-Glicerol e [U-¹⁴C]-Glicose foram expressas em pmol de glicose, de frutose e de glicerol convertidos a glicose e incorporados ao glicogênio/100 mg tecido/hora.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 7 – 15.

Os dados foram analisados por Test T de Student (para comparação entre dietas).

^a difere do grupo Normoprotéico Normolipídico (p < 0,001).

Como pode ser observado (Tab. 6) a glicemia foi menor no grupo hipoprotéico normolipídico em relação ao grupo normoprotéico normolipídico. Estes resultados em conjunto com os resultados da concentração hepática de glicogênio e a síntese hepática de glicogênio a partir de frutose e de glicerol sugerem que o grupo hipoprotéico normolipídico, aos 60 dias de idade, apresentou maior sensibilidade à insulina em relação ao grupo normoprotéico normolipídico.

Tabela 6: Glicemia

Dietas	Glicose
Normoprotéico (caseína) Normolipídico	156,00 ± 4,5
Hipoprotéico (caseína) Normolipídico	120,83 ± 5,6 ^a

A glicemia foi expressa em mg%.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 23 – 24.

Os dados foram analisados por Test T de Student (para comparação entre dietas).

a difere do grupo Normoprotéico Normolipídico (p < 0,001).

EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO CRÔNICA DESDE O PERÍODO GESTACIONAL ATÉ OS 4 MESES DE IDADE SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E DE LIPÍDEOS EM RATAS.

Como pode ser observado (Fig. 2) a massa corporal do grupo que foi submetido à desnutrição protéica foi menor em relação ao grupo normonutrido em todas as idades avaliadas com exceção dos valores observados no 1º dia de vida pós-natal.

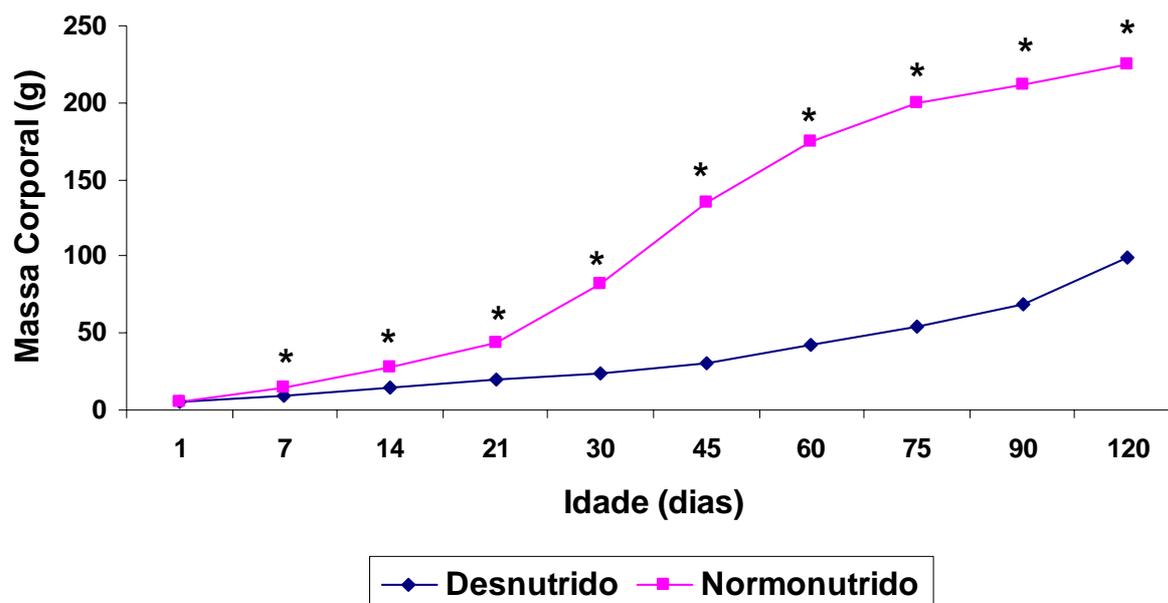


Figura 2: Massa Corporal

A massa corporal foi expressa em g.

Resultados foram expressos como média \pm EPM. n = 10 – 50.

Os dados foram analisados por Test T de Student (para comparação entre dietas).

* difere do grupo Desnutrido ($p < 0,001$).

Associado ao monitoramento da massa corporal dos grupos experimentais em estudo foi observado o efeito da desnutrição protéica crônica (Fig. 3) sobre o consumo de ração.

Como pode ser observado (Fig. 3) o consumo de ração do grupo desnutrido foi menor do 24º ao 90º dia em relação ao grupo normonutrido. Entre o 60º e 90º dia o consumo de ração do grupo desnutrido teve um aumento de 72,7% paralelo ao aumento de 68,0% de sua massa corporal. Mas o grupo normonutrido teve um aumento de apenas 8,5% e 21,37% em relação ao consumo de ração e à massa corporal, respectivamente. Aos 120 dias de idade, o consumo de ração do grupo desnutrido foi 11,9% maior que o do grupo normonutrido.

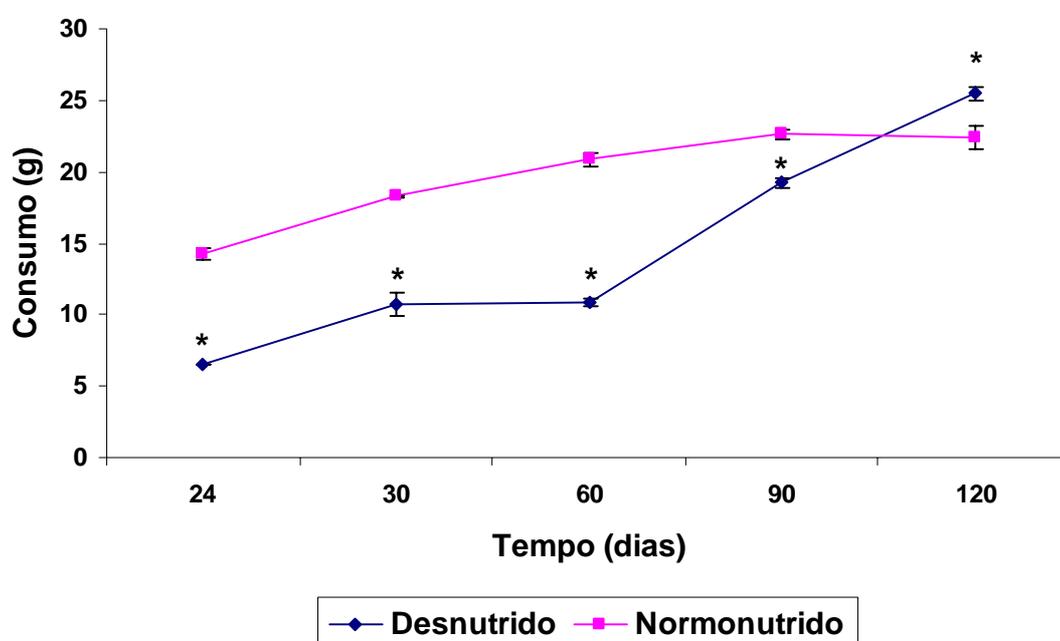


Figura 3: Consumo de Ração

O consumo de ração foi expresso em g.

Resultados foram expressos como média \pm EPM. n = 5 – 14.

Os dados foram analisados por Test T de Student (para comparação entre dietas).

* difere do grupo Normonutrido ($p < 0,05$).

Considerando que dietas hipoprotéicas podem induzir alterações sobre alguns órgãos e tecidos, bem como sobre a massa corporal, estabelecemos o coeficiente entre a massa de alguns tecidos (hepático, adiposo) e a massa corporal.

Como pode ser visto (Tab. 7) a relação do peso do fígado/100 g massa corporal no grupo desnutrido foi maior 11,4% e 33,1% em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial e ao grupo normonutrido, respectivamente.

Tabela 7: Relação Peso do Fígado/100 g Massa Corporal

	Relação Peso do Fígado/100 g Massa Corporal
Dietas	
Comercial	$3,5 \pm 0,05^b$
Normonutrido	$2,93 \pm 0,08^a$
Desnutrido	$3,9 \pm 0,09^c$

Resultados foram expressos como média \pm EPM. n = 7 – 10.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas).

Diferentes letras indicam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,01$).

Como pode ser observado (Tab. 8) a relação do tecido adiposo total /100 g massa corporal foi maior no grupo normonutrido em relação aos demais grupos experimentais estudados.

A relação do tecido adiposo total /100 g massa corporal no grupo desnutrido foi 45,4% menor em relação ao grupo normonutrido.

Tabela 8: Relação do Tecido Adiposo Total/100 g Massa Corporal

	Relação Tecido Adiposo Total/ 100 g Massa Corporal
Dietas	
Comercial	$2,92 \pm 0,17^a$
Normonutrido	$5,81 \pm 0,30$
Desnutrido	$3,17 \pm 0,24^a$

As Relações de Tecido Adiposo Total /100g Massa Corporal foram expressas em g tecido adiposo Total /100 g massa corporal.

Resultados foram expressos como média \pm EPM. n = 3 – 10.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas).

a difere do grupo Normonutrido (p < 0,05).

A albumina é uma proteína plasmática sintetizada exclusivamente no fígado e suas concentrações variam em função da ingestão protéica.

Como pode ser observado (Tab. 9) a concentração de albumina no grupo desnutrido foi menor 14,2% e 25,1% em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial e ao grupo normonutrido, respectivamente.

Tabela 9: Concentração Plasmática de Albumina

	Albumina
Dietas	
Comercial	3,30 ± 0,05 ^b
Normonutrido	3,78 ± 0,05 ^c
Desnutrido	2,89 ± 0,1 ^a

A concentração plasmática de albumina foi expressa em mg%.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 7 – 10.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas).

Diferentes letras indicam grupos estatisticamente diferentes (p < 0,05).

Como pode ser observado (Tab. 10) a concentração hepática de glicogênio do grupo desnutrido foi maior 171,9% e 254,5% em relação ao grupo normonutrido e ao grupo que foi submetido à dieta comercial, respectivamente, mostrando o efeito da desnutrição protéica sobre este parâmetro.

Observou-se, também, que a incorporação de glicose ao glicogênio hepático a partir de [U-¹⁴C]-glicerol no grupo desnutrido foi 65% maior em relação ao grupo normonutrido.

Tabela 10: Concentração Hepática de Glicogênio e Incorporação *In Vitro* de Glicose Proveniente de [U-¹⁴C]-Glicerol ao Glicogênio Hepático em Fatias de Fígado

Dietas	Concentração Glicogênio	Síntese Glicogênio
Comercial	3,52 ± 0,4 ^d	20,78 ± 1,7 ^c
Normonutrido	4,59 ± 0,1 ^d	9,42 ± 0,3 ^a
Desnutrido	12,48 ± 0,6	15,54 ± 0,4 ^b

As concentrações de glicogênio foram expressas em mg% e a velocidade de síntese de glicogênio a partir [U-¹⁴C]-Glicerol foi expressa em pmol de glicerol convertido a glicose e incorporado ao glicogênio/100 mg tecido/hora.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 7 – 11.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test T de Student (para comparação entre idades).

Diferentes letras indicam grupos estatisticamente diferentes (p < 0,05).

d difere do grupo Desnutrido (p < 0,05).

A má nutrição durante períodos críticos do crescimento e do desenvolvimento altera o metabolismo de filhotes de ratos em relação a homeostase da glicose. Observaram-se, então, os efeitos da desnutrição crônica sobre a captação de 2-deoxiglicose em músculo sóleo, o teste de sensibilidade à insulina (TSI) e o teste de tolerância à glicose (TTG) em ratas.

Como pode ser observado (Tab. 11) a captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo foi 29,8% maior no grupo desnutrido em relação ao grupo normonutrido.

Tabela 11: Captação de 2-Deoxiglicose em Fatias de Músculo Sóleo

Dietas	Captação de 2-Deoxiglicose em Fatias de Músculo Sóleo
Normonutrido	3557,18 ± 112,5
Desnutrido	4617,96 ± 90,4 ^a

A captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo foi expressa em pmol/100 mg tecido/30 minutos.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 9.

Os dados foram analisados por Test T de Student (para comparação entre dietas).

a difere do grupo Normonutrido (p < 0,001).

Como pode ser observado (Fig. 4) o grupo desnutrido apresentou uma glicemia menor aos 30, 60 e 120 minutos após a injeção i.p. de glicose em relação ao grupo normonutrido, mostrando uma melhor tolerância à glicose nestes respectivos tempos.

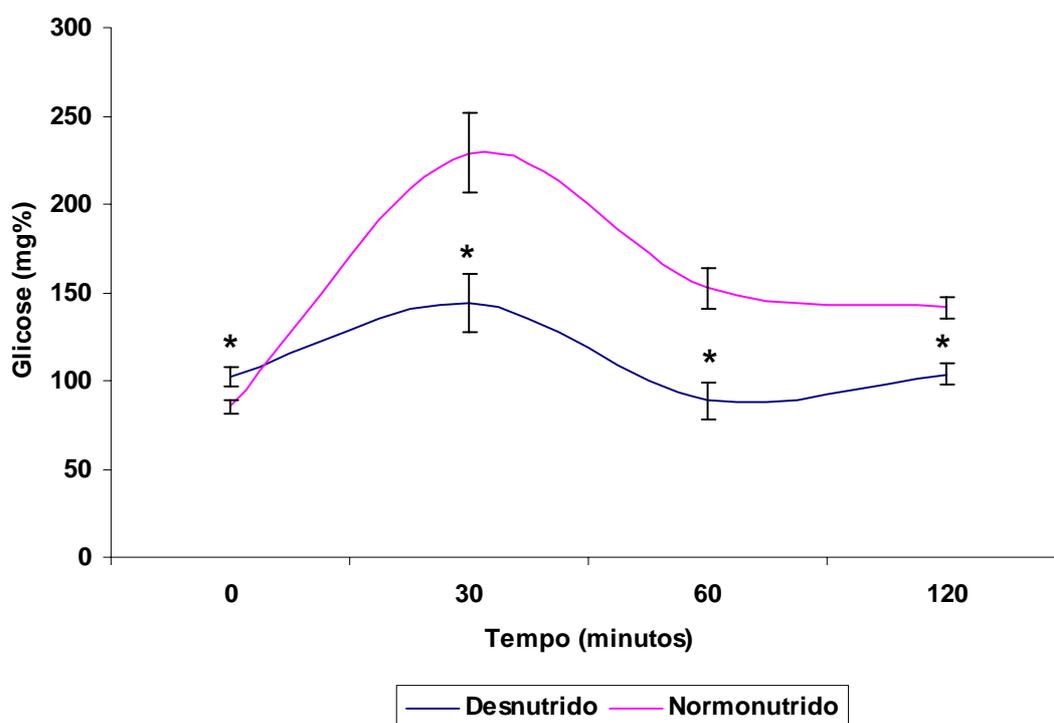


Figura 4: Teste de Tolerância à Glicose após a injeção i.p. de Glicose (2,0 g/Kg Rato)

A glicemia foi expressa em mg%.

Resultados foram expressos como média \pm EPM. n = 7 – 10.

Os dados foram analisados por Test T de Student (para comparação entre dietas).

* difere do grupo Normonutrido ($p < 0,05$).

Como pode ser visto (Fig. 5) a glicemia do grupo desnutrido foi menor aos 30 e 60 minutos após a injeção i.p. de insulina em relação ao grupo normonutrido, indicando uma maior sensibilidade à insulina.

Estes resultados em conjunto com os resultados do TTG e captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo mostraram que o grupo desnutrido apresentou melhor tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em relação ao grupo normonutrido.

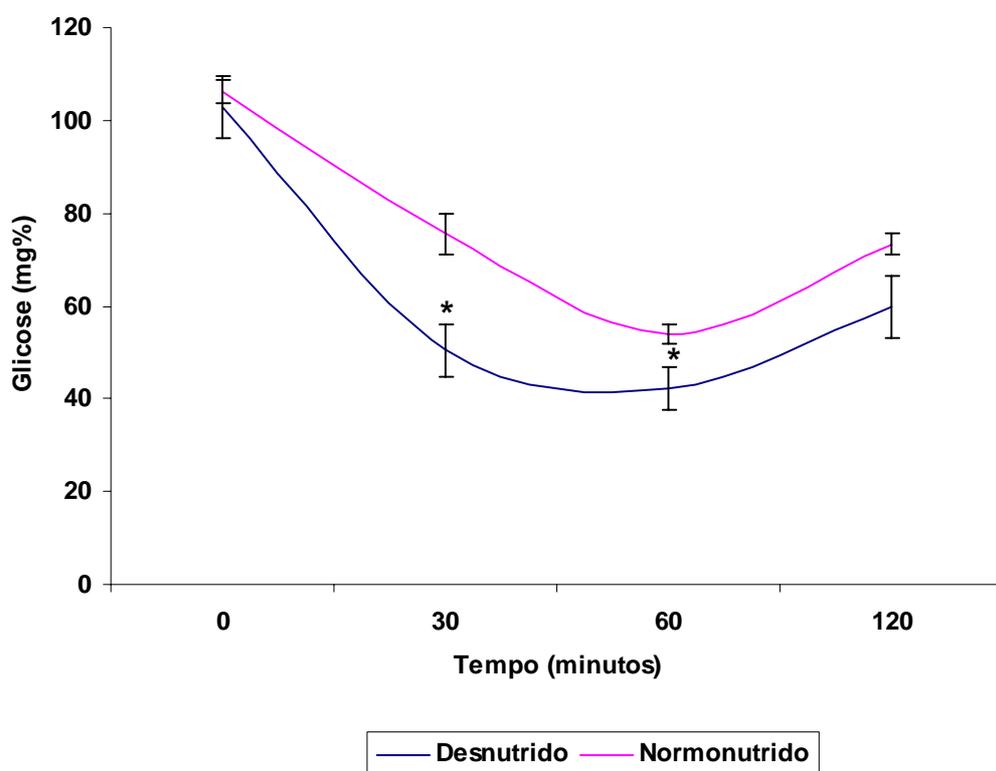


Figura 5: Teste de Sensibilidade à Insulina após a injeção i.p. de Insulina (0,75 mU/Kg Rato)

A glicemia foi expressa em mg%.

Resultados foram expressos como média \pm EPM. $n = 7 - 10$.

Os dados foram analisados por Test T de Student (para comparação entre dietas).

* difere do grupo normonutrido ($p < 0,05$).

Observou-se (Tab. 12) que a glicemia do grupo que foi submetido à dieta comercial foi menor em relação aos demais grupos experimentais estudados.

Tabela 12: Glicemia

	Glicemia
Dietas	
Comercial	99,86 ± 3,1
Normonutrido	139,1 ± 3,2 ^a
Desnutrido	132,60 ± 4,2 ^a

A glicemia foi expressa em mg%.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 7 – 10.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas).

a difere do grupo que foi submetido à dieta comercial (p < 0,05).

O fígado é o órgão central na regulação do metabolismo lipídico, atuando na síntese de triglicerídeos, de colesterol e de lipoproteínas circulantes. Em função das alterações observadas no peso do fígado, bem como no metabolismo de carboidratos, observamos os efeitos da desnutrição protéica crônica sobre parâmetros lipídicos hepático e séricos.

Como pode ser observado (Tab. 13) o grupo desnutrido apresentou um aumento de 177,8% na concentração hepática de triglicerídeos em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial.

Observou-se, também, que a concentração hepática de triglicerídeos do grupo desnutrido foi maior em relação ao grupo normonutrido mas não foi estatisticamente diferente.

Tabela 13: Concentração Hepática e Plasmática de Triglicerídeos

	Concentração Triglicerídeos	
	Fígado	Soro
Dietas		
Comercial	6,70 ± 0,62	0,92 ± 0,1
Normonutrido	16,67 ± 0,5 ^a	1,01 ± 0,1
Desnutrido	18,61 ± 1,1 ^a	1,01 ± 0,1

A concentração hepática de triglicerídeos foi expressa em $\mu\text{mol/g}$ e a concentração plasmática de triglicerídeos foi expressa em mmol/L .

Resultados foram expressos como média \pm EPM. $n = 7 - 10$.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test T de Student (para comparação entre idades).

a difere do grupo submetido à dieta comercial ($p < 0,05$).

Como pode ser visto (Tab. 14) as concentrações de colesterol total e de lipídeos totais do grupo desnutrido foram maiores do que os demais grupos experimentais.

A concentração de HDL-colesterol do grupo desnutrido foi 31% maior em relação ao grupo normonutrido.

Tabela 14: Concentração Plasmática de: HDL-Colesterol, Colesterol Total e Lipídeos Totais

	Soro		
	HDL-Col	Colesterol Total	Lipídeos Totais
Dietas			
Comercial	35,00 ± 2,4 ^{a,b}	1,26 ± 0,09 ^c	378,28 ± 9,7 ^c
Normonutrido	30,00 ± 1,7 ^a	1,25 ± 0,07 ^c	384,40 ± 14,2 ^c
Desnutrido	39,30 ± 1,5 ^b	1,72 ± 0,06	435,30 ± 17,6

As concentrações de HDL-colesterol e de Lipídeos Totais foram expressas em mg% e a concentração de Colesterol Total foi expressa em mmol/L.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 7 – 10.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test T de Student (para comparação entre idades).

Diferentes letras indicam grupos estatisticamente diferentes (p < 0,05).

c difere do grupo Desnutrido (p < 0,05).

A fosfatase alcalina é utilizada clinicamente, na rotina laboratorial como marcador de patologias hepáticas e ósseas. A atividade sérica aumentada da amilase e da lipase é útil para o diagnóstico de pancreatites. Observaram-se, então, os efeitos da desnutrição crônica sobre a atividade enzimática da amilase, da lipase e da fosfatase alcalina.

Como pode ser observado (Tab. 15) a atividade da amilase foi menor 9,3% e 32,2% nos grupos desnutrido e normonutrido, respectivamente, em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial.

A atividade da lipase foi maior nos grupos desnutrido e normonutrido em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial.

Observou-se, também, que a atividade da fosfatase alcalina do grupo desnutrido teve um aumento de 181,5% e 214,6% em relação ao grupo normonutrido e ao grupo que foi submetido à dieta comercial, respectivamente.

Tabela 15: Atividade de Enzimas Plasmáticas em Ratas

Dietas	Soro		
	Amilase	Lipase	Fosfatase alcalina
Comercial	2141,57 ± 69,9 ^c	38,50 ± 0,9	138,57 ± 10,5 ^e
Normonutrido	1344,10 ± 45,7 ^a	43,89 ± 1,8 ^d	154,90 ± 7,7 ^e
Desnutrido	1942,20 ± 70,0 ^b	43,30 ± 0,8 ^d	436,00 ± 33,5

As atividades de Amilase, Lipase e Fosfatase Alcalina foram expressas em U/L.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 6 – 10.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test T de Student (para comparação entre idades).

Diferentes letras indicam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

d difere do grupo submetido à dieta comercial ($p < 0,05$).

e difere do grupo Desnutrido ($p < 0,05$).

EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO GESTACIONAL E LACTACIONAL ASSOCIADO À DIETA NORMOPROTÉICA (25%) E HIPERLIPÍDICA (42%) A PARTIR DO DESMAME ATÉ 4 E 8 MESES DE IDADE SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E DE LIPÍDEOS EM RATAS.

Como pode ser observado (Fig. 6) até os 120 dias de idade o grupo hipoprotéico hiperlipídico apresentou menor massa corporal em relação ao grupo normoprotéico hiperlipídico. Esta diferença foi mais pronunciada aos 21 dias de idade, onde a massa corporal foi 45,7% da massa corporal dos ratos do grupo normoprotéico hiperlipídico.

Observou-se, também, que entre 150 e 240 dias de idade, não houve diferença na massa corporal entre os dois grupos experimentais. Mas, neste período, a massa corporal do grupo hipoprotéico hiperlipídico foi maior do que o grupo normoprotéico hiperlipídico, mas esta diferença não foi significativa.

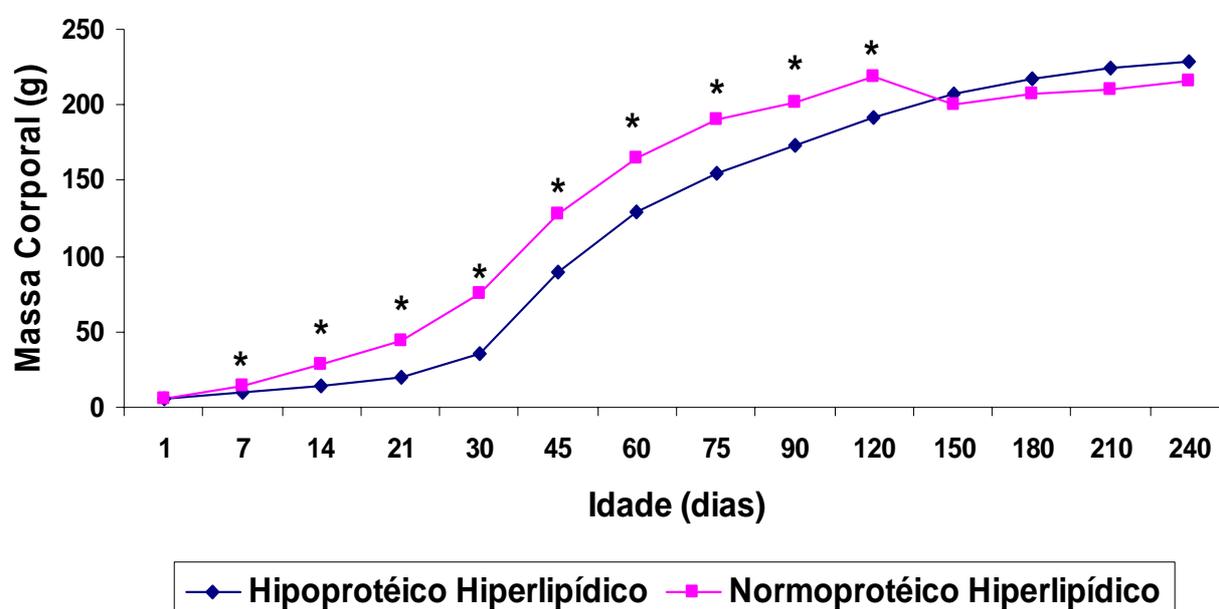


Figura 6: Massa Corporal

A massa corporal foi expresso em g.

Resultados foram expressos como média \pm EPM. n = 5 - 50.

Os dados foram analisados por Test T de Student (para comparação entre dietas).

* difere do grupo Hipoprotéico Hiperlipídico ($p < 0,001$).

Associado ao monitoramento da massa corporal dos grupos experimentais em estudo foi observado os efeitos da desnutrição gestacional e lactacional associado à dieta normoprotéica (25%) e hiperlipídica (42%) sobre o consumo de ração.

Como pode ser observado (Fig. 7) o consumo de ração do grupo hipoprotéico hiperlipídico foi menor até os 120 dias em relação ao grupo normoprotéico hiperlipídico.

Observou-se, também que dos 120 até os 210 dias o consumo de ração entre os grupos experimentais não houve diferença, no entanto, aos 240 dias o consumo de ração do grupo hipoprotéico hiperlipídico foi 11,4% maior do que grupo normoprotéico hiperlipídico.

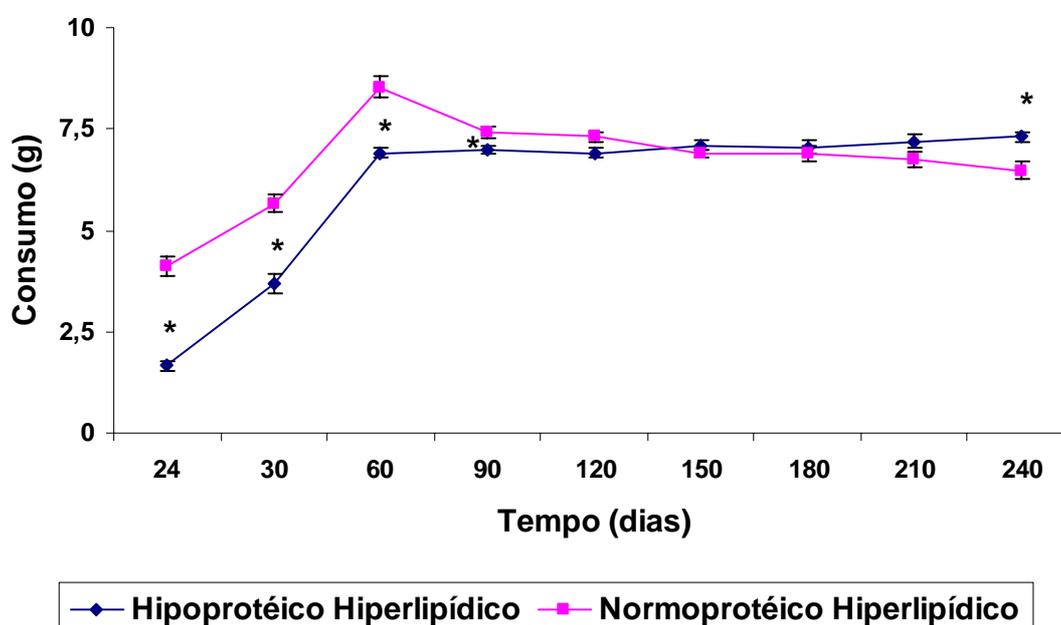


Figura 7: Consumo de Ração

O consumo de ração foi expresso em g.

Resultados foram expressos como média \pm EPM. n = 4 – 15.

Os dados foram analisados por Test T de Student (para comparação entre dietas).

* difere do grupo Normoprotéico Hiperlipídico ($p < 0,05$).

Considerando que as dietas hiperlipídicas podem induzir a alterações sobre alguns órgãos e tecidos, bem como sobre a massa corporal, estabelecemos o coeficiente entre a massa de alguns tecidos (hepático, adiposo) e a massa corporal.

Como pode ser visto (Tab. 16) a relação do peso do fígado/100 g massa corporal no grupo hipoprotéico hiperlipídico, aos 4 meses de idade, foi maior em relação ao grupo normoprotéico hiperlipídico, mas quando o comparamos com o grupo que foi submetido à dieta comercial esta relação é menor.

Observou-se, também, que o grupo hipoprotéico hiperlipídico mostrou uma redução na relação do peso do fígado/ 100 g massa corporal aos 8 meses de idade.

Tabela 16: Relação Peso do Fígado/100 g Massa Corporal em Ratas com 4 e 8 Meses de Idade

Dietas	Relação Peso do Fígado/100 g Massa Corporal	
	4 meses	8 meses
Comercial	3,51 ± 0,05 ^c	3,4 ± 0,10
Normoprotéico Hiperlipídico	2,86 ± 0,07 ^a	2,6 ± 0,20 ^a
Hipoprotéico Hiperlipídico	3,12 ± 0,07 ^b	2,6 ± 0,09 ^{a,**}

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 5 – 13.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test T de Student (para comparação entre idades).

Diferentes letras indicam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

^a difere do grupo submetido à dieta comercial ($p < 0,01$).

^{**} difere do grupo com 4 meses de idade ($p < 0,001$).

A relação do tecido adiposo total e visceral/100 g massa corporal foi maior nos grupos hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos (nas duas idades estudadas) em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial, mostrando o efeito crônico de uma alimentação rica em lipídeo saturado sobre a deposição de tecido adiposo abdominal.

Tabela 17: Relação do Tecido Adiposo Total e Visceral/100 g Massa Corporal em Ratas com 4 e 8 Meses de Idade

Dietas	Relação Tecido Adiposo Total/ 100 g Massa Corporal		Relação Tecido Adiposo Visceral /100 g Massa Corporal
	4 meses	8 meses	4 meses
Comercial	2,92 ± 0,17	2,90 ± 0,3	1,09 ± 0,09
Normoprotéico Hiperlipídico	8,94 ± 0,71 ^a	7,18 ± 0,79 ^a	2,40 ± 0,15 ^a
Hipoprotéico Hiperlipídico	7,52 ± 0,93 ^a	8,49 ± 0,97 ^a	2,53 ± 0,2 ^a

As Relações de Tecido Adiposo Total e Visceral/100g Massa Corporal foram expressas em g tecido adiposo Total ou Visceral/100 g massa corporal, respectivamente.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 3 – 13.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test T de Student (para comparação entre idades).

^a difere do grupo submetido à dieta comercial (p < 0,01).

A albumina é uma proteína plasmática sintetizada exclusivamente no fígado e suas concentrações variam em função da ingestão protéica.

Como pode ser observado (Tab. 18) a concentração de albumina no grupo hipoprotéico hiperlipídico, aos 4 meses de idade, foi menor em relação ao grupo normoprotéico hiperlipídico. No entanto, aos 8 meses, a diferença na concentração de albumina entre estes dois grupos desapareceu.

Tabela 18: Concentração Plasmática de Albumina em Ratas com 4 e 8 Meses de Idade

Dietas	Albumina	
	4 meses	8 meses
Comercial	3,30 ± 0,05 ^a	3,58 ± 0,06 ^{**}
Normoprotéico Hiperlipídico	3,80 ± 0,11	3,94 ± 0,09
Hipoprotéico Hiperlipídico	3,46 ± 0,09 ^a	3,67 ± 0,13

A concentração plasmática de albumina foi expressa em mg%.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 5 – 12.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test T de Student (para comparação entre idades).

^a difere do grupo Normoprotéico Hiperlipídico (p < 0,05).

^{**} difere do grupo com 4 meses de idade (p < 0,01).

Como pode ser observado (Tab. 19) a concentração hepática de glicogênio e a síntese hepática de glicogênio a partir de [U-¹⁴C]-glicerol, aos 8 meses de idade, foram maiores no grupo que foi submetido à dieta comercial em relação aos grupos hiperlipídicos.

Quando comparamos a síntese hepática de glicogênio em função do desenvolvimento (4 e 8 meses) observou-se uma redução neste parâmetro, aos 8 meses de idade, independentemente do grupo experimental estudado. Como pode ser visto (Tab. 19) esta redução (63,4%) foi mais significativa no grupo hipoprotéico hiperlipídico, mostrando uma associação entre a desnutrição nestes períodos críticos do crescimento e do desenvolvimento com um consumo crônico de uma dieta rica em lipídeo.

Tabela 19: Concentração Hepática de Glicogênio e Incorporação *In Vitro* de Glicose Proveniente de [U-¹⁴C]-Glicerol ao Glicogênio Hepático, em Fatias de Fígado de Ratas com 4 e 8 Meses de Idade

Dietas	Concentração Glicogênio		Síntese Glicogênio	
	4 meses	8 meses	4 meses	8 meses
Comercial	3,52 ± 0,4	5,67 ± 0,6 ^{**}	20,78 ± 1,7	11,34 ± 0,8 ^{**}
Normoprotéico Hiperlipídico	3,32 ± 0,07	2,61 ± 0,2 ^{**,a}	18,56 ± 1,2	8,88 ± 0,5 ^{**,a}
Hipoprotéico Hiperlipídico	3,26 ± 0,2	3,80 ± 0,3 ^a	22,96 ± 1,5	8,40 ± 0,3 ^{**,a}

As concentrações de glicogênio foram expressas em mg% e a velocidade de síntese de glicogênio a partir [U-¹⁴C]-Glicerol foi expressa em pmol de glicerol convertido a glicose e incorporado ao glicogênio/100 mg tecido/hora.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 5 – 12.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test T de Student (para comparação entre idades).

a difere do grupo submetido à dieta comercial (p < 0,01).

****** difere do grupo com 4 meses de idade (p < 0,05).

Sabe-se que o consumo crônico de uma dieta hiperlipídica leva ao acúmulo de tecido adiposo intra-abdominal, que está fortemente relacionado à redução da sensibilidade à insulina. Observaram-se, então, os efeitos da desnutrição gestacional e lactacional associado à dieta normoprotéica (25%) e hiperlipídica (42%) sobre a captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo, a glicemia, o TSI e o TTG em ratas com 8 meses de idade.

Como pode ser observado (Tab. 20) a captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo foi menor nos grupos Hipoprotéico e Normoprotéico Hiperlipídicos. Mas apenas o grupo Hipoprotéico Hiperlipídico apresentou uma redução significativa (15,35%) na captação de 2-deoxiglicose em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial.

Tabela 20: Captação de 2-Deoxiglicose em Fatias de Músculo Sóleo de Ratas Com 8 Meses de Idade

Dietas	Captação de 2-Deoxiglicose em Fatias de Músculo Sóleo
	8 meses
Comercial	3612,00 ± 212,1 ^b
Normoprotéico Hiperlipídico	3223,15 ± 80,0 ^{a,b}
Hipoprotéico Hiperlipídico	3057,70 ± 98,5 ^a

A captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo foi expressa em pmol/100 mg tecido/30 minutos.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 5 – 9.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas).

Diferentes letras indicam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Como pode ser visto (Tab. 21) a glicemia nos grupos hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos, aos 4 meses de idade, foi superior em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial.

Observou-se que, aos 8 meses, a concentração plasmática de glicose do grupo hipoprotéico hiperlipídico foi 11,8% maior em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial.

Quando comparamos a concentração plasmática de glicose em função do desenvolvimento (4 e 8 meses) observou-se um aumento de 13,2% neste parâmetro, aos 8 meses de idade, no grupo hipoprotéico hiperlipídico.

Tabela 21: Glicemia em Ratas com 4 e 8 Meses de Idade

Dietas	Glicemia	
	4 meses	8 meses
Comercial	99,86 ± 3,1	117,83 ± 5,7 ^{**} , ^a
Normoprotéico Hiperlipídico	120,38 ± 2,6 ^c	121,6 ± 4,4 ^a , ^b
Hipoprotéico Hiperlipídico	116,30 ± 3,7 ^c	131,70 ± 2,4 ^{**} , ^b

A glicemia foi expressa em mg%.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 5 – 13.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test T de Student (para comparação entre idades).

Diferentes letras indicam grupos estatisticamente diferentes (p < 0,05).

^c difere do grupo que foi submetido à dieta comercial (p < 0,05).

^{**} difere do grupo com 4 meses (p < 0,05).

Como pode ser observado (Fig. 8) houve um aumento na glicemia, no estado de jejum, no grupo normoprotéico hiperlipídico em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial, aos 8 meses de idade.

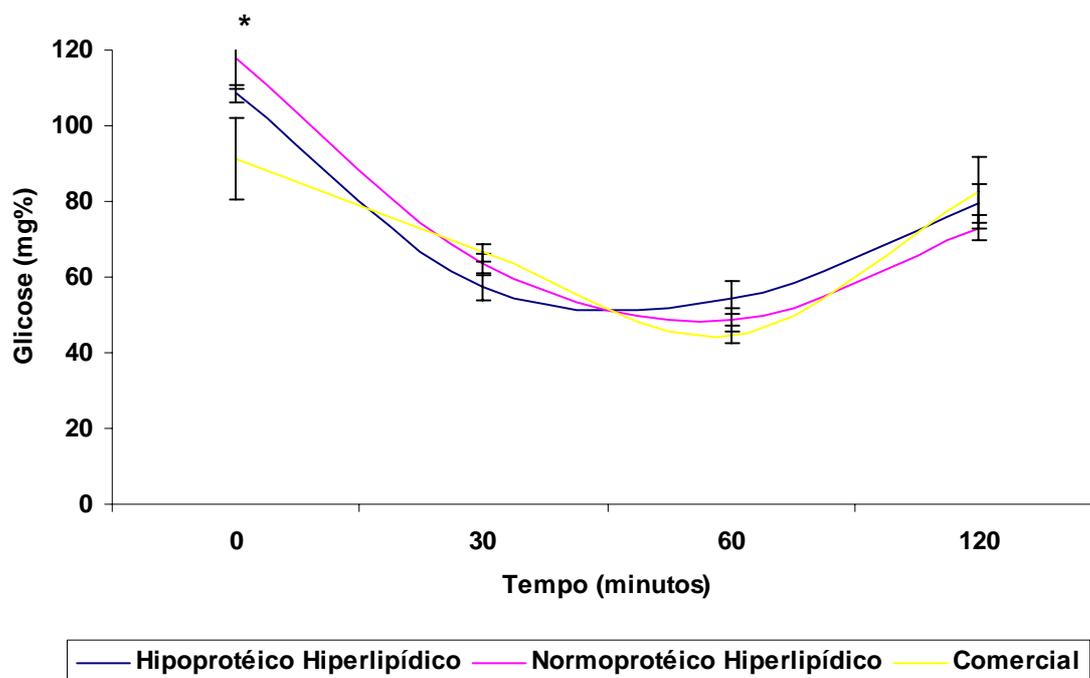


Figura 8: Teste de Sensibilidade à Insulina após a injeção i.p. de Insulina (1,0 mU/Kg Rato) em Ratas com 8 Meses de Idade

A glicemia foi expressa em mg%.

Resultados foram expressos como média \pm EPM. n = 5 – 13.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas).

* grupo Normoprotéico Hiperlipídico difere do grupo submetido à dieta Comercial ($p < 0,05$).

Como pode ser observado (Fig. 9) o grupo Hipoprotéico Hiperlipídico, aos 8 meses de idade, apresentou uma glicemia aumentada, aos 30 e 60 minutos, em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial após a injeção i.p. de glicose, indicando uma intolerância à glicose nestes respectivos tempos.

Estes resultados, em conjunto com os resultados da glicemia e da captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo destes animais mostram que a desnutrição gestacional e lactacional associada à ingestão crônica de uma dieta rica em lipídeo, principalmente saturado, produzem intolerância à glicose em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial, aos 8 meses de idade.

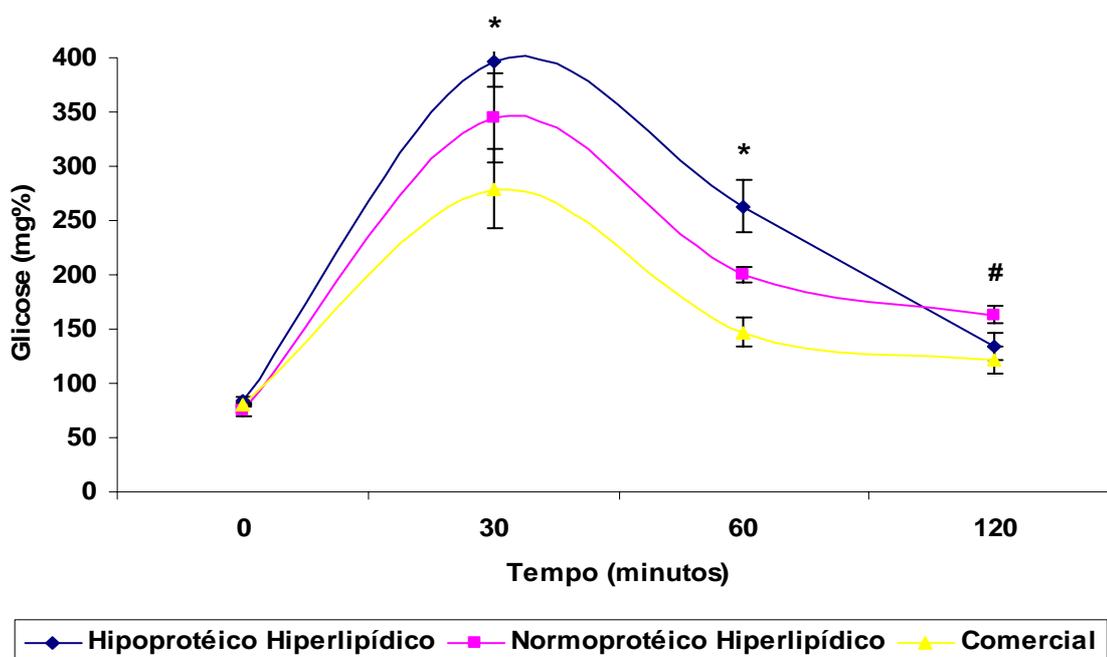


Figura 9: Teste de Tolerância à Glicose após a injeção i.p. de Glicose (2,0 g/Kg Rato) em Ratas com 8 Meses de Idade

A glicemia foi expressa em mg%.

Resultados foram expressos como média \pm EPM. n = 5 – 13.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas).

* grupo Hipoprotéico Hiperlipídico difere do grupo submetido à dieta Comercial (p < 0,05).

grupo Normoprotéico Hiperlipídico difere do grupo submetido à dieta Comercial (p < 0,05).

O fígado é o órgão central na regulação do metabolismo lipídico, atuando na síntese de triglicerídeos, de colesterol e de lipoproteínas circulantes. Em função das alterações observadas no peso do fígado, bem como no metabolismo de carboidratos, observamos os efeitos da desnutrição gestacional e lactacional associado à dieta normoprotéica (25%) e hiperlipídica (42%) em ratas com 4 e 8 meses de idade sobre parâmetros lipídicos hepático e séricos.

Como pode ser observado (Tab. 22) as concentrações hepática e plasmática de triglicerídeos foram maiores nos grupos hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial nas duas idades estudadas.

Observou-se, também, que entre os grupos hiperlipídicos o grupo que foi submetido à desnutrição gestacional e lactacional apresentou maior concentração hepática de triglicerídeos, aos 4 e 8 meses de idade.

Quando comparamos as concentrações hepática e plasmática de triglicerídeos em função do desenvolvimento (4 e 8 meses) observou-se um aumento de 45,3% e 43,0%, respectivamente, no grupo Hipoprotéico Hiperlipídico aos 8 meses de idade.

Estes dados mostram que a desnutrição protéica durante períodos críticos do crescimento e do desenvolvimento, associado ao consumo crônico de uma dieta hiperlipídica produz um fígado gorduroso e hipertrigliceridemia.

Tabela 22: Concentração Hepática e Plasmática de Triglicerídeos em Ratas com 4 e 8 Meses de Idade

Dietas	Concentração Triglicerídeos			
	Fígado		Soro	
	4 meses	8 meses	4 meses	8 meses
Comercial	7,13 ± 0,5 ^a	13,44 ± 0,6 ^{**,a}	0,92 ± 0,1 ^a	1,09 ± 0,2
Normoprotéico Hiperlipídico	14,36 ± 0,7 ^b	20,31 ± 1,5 ^{**,b}	5,00 ± 0,5 ^c	2,83 ± 0,8 ^{**,d}
Hipoprotéico Hiperlipídico	20,44 ± 1,6 ^c	29,70 ± 1,5 ^{**,c}	2,07 ± 0,2 ^b	2,96 ± 0,4 ^{**,d}

A concentração hepática de triglicerídeos foi expressa em $\mu\text{mol/g}$ e a concentração plasmática de triglicerídeos foi expressa em mmol/L .

Resultados foram expressos como média \pm EPM. $n = 5 - 10$.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test T de Student (para comparação entre idades).

Diferentes letras indicam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

d difere do grupo submetido à dieta comercial ($p < 0,05$).

** difere do grupo com 4 meses ($p < 0,05$).

Como pode ser observado (Tab. 23) a concentração plasmática de HDL-colesterol, aos 4 meses de idade, e as concentrações plasmáticas de colesterol e de lipídeos totais, nas duas idades avaliadas, foram maiores nos grupos hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos.

Quando comparamos a concentração plasmática de HDL-colesterol em função do desenvolvimento (4 e 8 meses) observou-se uma redução de 25,25% no grupo hipoprotéico hiperlipídico aos 8 meses de idade, mostrando o efeito da desnutrição em períodos críticos do crescimento e do desenvolvimento, associada à ingestão crônica de uma dieta rica em lipídeo, sobre o perfil lipídico.

Tabela 23: Concentração Plasmática de: HDL-Colesterol, Colesterol Total e Lipídeos Totais em Ratas com 4 e 8 Meses de Idade

Dietas	Soro					
	HDL-Col		Colesterol Total		Lipídeos Totais	
	4 meses	8 meses	4 meses	8 meses	4 meses	8 meses
Comercial	35,00 ± 2,4 ^a	31,17 ± 2,6 ^d	1,26 ± 0,09 ^a	1,32 ± 0,1 ^a	378,28 ± 9,7 ^a	424,33 ± 25,4
Normoprotéico Hiperlipídico	45,69 ± 0,9 ^c	39,6 ± 3,5 ^{**}	2,29 ± 0,1 ^c	1,61 ± 0,1 ^{** ,a,b}	665,17 ± 48,7 ^c	571,60 ± 81,8 ^e
Hipoprotéico Hiperlipídico	40,40 ± 1,1 ^b	30,20 ± 1,0 ^{** ,d}	1,78 ± 0,05 ^b	1,70 ± 0,07 ^b	508,00 ± 19,5 ^b	587,11 ± 35,9 ^e

As concentrações de HDL-colesterol e Lipídeos Totais foram expressas em mg% e a concentração de Colesterol Total foi expressa em mmol/L.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 5 – 13.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test T de Student (para comparação entre idades).

Diferentes letras indicam grupos estatisticamente diferentes (p < 0,05).

^d difere do grupo Normoprotéico Hiperlipídico (p < 0,05).

^e difere do grupo submetido à dieta comercial (p < 0,05).

^{**} difere do grupo com 4 meses (p < 0,05).

A fosfatase alcalina é utilizada clinicamente, na rotina laboratorial como marcador de patologias hepáticas e ósseas. A atividade sérica aumentada da amilase e da lipase é útil para o diagnóstico de pancreatites. Observaram-se, então, os efeitos da desnutrição gestacional e lactacional associado à dieta normoprotéica (25%) e hiperlipídica (42%) em ratas com 4 e 8 meses de idade sobre a atividade enzimática da amilase, da lipase e da fosfatase alcalina.

Como pode ser observado (Tab. 24) o grupo hipoprotéico hiperlipídico, aos 4 meses de idade, apresentou maior atividade da enzima amilase, comparado ao grupo que foi submetido à dieta comercial.

Observou-se que a atividade da fosfatase alcalina foi maior nos grupos hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos, nas duas idades estudadas, em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial.

Como pode ser visto (Tab. 24) houve um importante aumento na atividade da lipase (5 e 6 vezes) no grupo normoprotéico hiperlipídico, aos 8 meses de idade, em relação aos demais grupos experimentais, bem como com a idade de 4 meses.

Tabela 24: Atividade de Enzimas Plasmáticas em Ratas com 4 e 8 Meses de Idade

Dietas	Soro					
	Amilase		Lipase		Fosfatase alcalina	
	4 meses	8 meses	4 meses	8 meses	4 meses	8 meses
Comercial	2141,6 ± 70,0 ^a	1564,2 ± 115,1 ^{**,b}	38,5 ± 0,9 ^b	46,5 ± 6,5 ^c	138,6 ± 10,5	113,8 ± 16,1
Normoprotéico	2276,7 ± 93,6 ^{a,b}	1321,40 ± 49,6 ^{**,a}	35,1 ± 0,5 ^a	239,75 ± 10,1 ^{**}	332,0 ± 31,2 ^d	233,6 ± 39,0 ^d
Hipoprotéico	2503,8 ± 109,7 ^b	1367,30 ± 50,7 ^{**,a,b}	37,4 ± 1,2 ^{a,b}	40,6 ± 1,0 ^{**,c}	326,9 ± 26,5 ^d	261,2 ± 19,0 ^d

As atividades de Amilase, Lipase e Fosfatase Alcalina foram expressas em U/L.

Resultados foram expressos como média ± EPM. n = 5 – 13.

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de Duncan múltipla amplitude (para comparação entre dietas) e por Test T de Student (para comparação entre idades).

Diferentes letras indicam grupos estatisticamente diferentes (p < 0,05).

c difere do grupo Normoprotéico Hiperlipídico (p < 0,05).

d difere do grupo submetido à dieta comercial (p < 0,05).

** difere do grupo com 4 meses (p < 0,05).

DISCUSSÃO

**EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PRÉ-GESTACIONAL, GESTACIONAL
E LACTACIONAL SOBRE O METABOLISMO HEPÁTICO DE
CARBOIDRATOS EM RATAS COM 2 MESES DE IDADE.**

E

**OS EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO CRÔNICA DESDE O PERÍODO
GESTACIONAL ATÉ OS 4 MESES DE IDADE SOBRE O
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E DE LIPÍDEOS EM RATAS.**

Uma adequada nutrição é um dos principais fatores para o desenvolvimento apropriado do organismo. Um adequado suprimento de nutrientes essenciais é necessário para a manutenção do crescimento e para o desenvolvimento normal de todas as funções fisiológicas.

A albumina é a proteína mais abundante no plasma, sintetizada exclusivamente no fígado e constitui 2/3 das proteínas plasmáticas totais (Richard, A. e McPherson, M. D., 1975). Uma diminuição no nível de albumina plasmática, devido à síntese prejudicada (por exemplo, desnutrição, má absorção, disfunção hepática) ou perda (por exemplo, ascite ou perda de proteína por nefropatia), resulta em sério desequilíbrio da pressão oncótica intravascular.

Como pode ser observado (Tab. 9) a concentração de albumina no grupo desnutrido foi menor 14,2% e 25,1% em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial e ao grupo normonutrido, respectivamente.

O fígado é o órgão central na regulação do metabolismo lipídico, atuando na síntese de triglicerídeos, de colesterol e de lipoproteínas circulantes. O nível de proteína na dieta tem mostrado influenciar o metabolismo de lipídeos. Em ratos, a desnutrição ocasiona uma diminuição na concentração de triglicerídeos plasmáticos, que foi correlacionado com um acúmulo destes lipídeos no fígado (Madani et al, 2000). A síntese reduzida da apolipoproteína hepática para a formação da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) é responsável pelo acúmulo de lipídeos no fígado (Madani et al, 2000).

Como pode ser observado em nossos resultados (Tab. 13) o grupo desnutrido apresentou um aumento de 177,8% na concentração hepática de triglicerídeos em relação ao grupo submetido à dieta comercial. Observou-se também que a concentração hepática de triglicerídeos no grupo desnutrido foi maior em relação ao grupo normonutrido mas não foi estatisticamente diferente.

Como pode ser visto em nossos resultados (Tab. 13) não houve diferença na concentração plasmática de triglicerídeos entre os grupos experimentais, mas observou-se (Tab. 14) que o grupo desnutrido apresentou um aumento nas concentrações de colesterol total e de lipídeos totais em relação ao grupo normonutrido e ao grupo que foi submetido à dieta comercial (que não diferiram entre si). Em relação a concentração de HDL-colesterol o grupo desnutrido apresentou um aumento de 31% em relação ao grupo normonutrido.

A fosfatase alcalina é utilizada clinicamente, na rotina laboratorial como marcador de patologias hepáticas e ósseas. A atividade sérica aumentada da amilase e lipase são úteis para o diagnóstico de pancreatites.

Como pode ser observado em nossos resultados (Tab. 15) a atividade da lipase foi maior nos grupos desnutrido e normonutrido (que não diferem entre si), em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial. Observou-se que a atividade da fosfatase alcalina no grupo desnutrido teve um aumento de 214,6% e de 181,5% em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial e ao grupo normonutrido, respectivamente.

A restrição de crescimento intra-uterino está acompanhada por mudanças órgão-seletiva na distribuição de nutrientes, tal que o crescimento do cérebro, por exemplo, é relativamente protegido em relação ao pâncreas e ao fígado (Winick e Noble, 1996; Desai et al 1996). Desai et al (1996) mostraram que filhotes de ratas que foram submetidas à restrição de proteínas na dieta durante a gestação e a lactação apresentaram uma redução no tamanho corporal, que não está associada com uma redução linear no peso dos órgãos internos: os pesos relativos do pâncreas, do músculo e do fígado, estão reduzidos no período do desmame, enquanto que o cérebro e os pulmões são relativamente protegidos.

Como pode ser observado em nossos resultados (Tab. 8) a relação peso do fígado/100 g massa corporal no grupo desnutrido foi maior 11,4% e 33,1% em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial e ao grupo normonutrido, respectivamente.

Desai et al (1996) mostraram que filhotes de ratas que foram submetidas a uma dieta com 8% de proteína durante a gestação nasceram significativamente menores tais que dois dias depois do nascimento eles pesaram cerca de 15 a 20% menos do que o grupo normoprotéico. Diferenças nos pesos entre os dois grupos de filhotes aumentaram se a mãe continuou a ser alimentada com um ração restrita em proteínas.

Em um outro estudo Desai et al (1997) mostraram que o peso corporal de ratos com 11 meses de idade, alimentados com uma ração normoprotéica, cujas mães receberam uma dieta com 8% proteína durante a gestação e lactação permaneceu significativamente reduzido.

Os resultados relativos a massa corporal de filhotes nascidos de ratas submetidas à desnutrição crônica desde o período gestacional até os 4 meses de idade (Fig. 2) estão de acordo com os mostrados por Desai et al (1996 e 1997). Como pode se observado em

nossos resultados (Fig. 2) a massa corporal do grupo desnutrido foi menor em relação ao grupo normonutrido em todas as idades avaliadas, com exceção dos valores obtidos no 1º dia de vida pós-natal. Observou-se, também, que o consumo de ração (Fig. 3) do grupo desnutrido foi menor do 24 ao 90º dia em relação ao grupo normonutrido. Entre o 60º e 90º dia o consumo de ração do grupo desnutrido teve um aumento de 77,21% paralelo ao aumento de 65,55% de sua massa corporal. Mas o grupo normonutrido teve um aumento de apenas 8,5% e 21,37% em relação ao consumo de ração e a massa corporal, respectivamente. Aos 120 dias de idade, o consumo de ração do grupo desnutrido foi 11,9% maior do que o do grupo normonutrido e em paralelo o grupo desnutrido teve um aumento de 43,8% na massa corporal entre 90 e 120 dias de idade, enquanto que o grupo normonutrido teve um aumento de apenas 6,4% nesse intervalo de tempo.

Observou-se, também, em nossos resultados (Tab. 8) que a relação do tecido adiposo total/100 g massa corporal do grupo desnutrido foi 45,4% menor em relação ao grupo normonutrido.

Desai et al (1997) mostraram que a atividade da enzima hepática glicocinase foi significativamente reduzida em ratos com 3 meses de idade alimentados com uma ração normoprotéica, cujas mães foram submetidas a uma dieta com 8% de proteína durante o período gestacional e lactacional. A atividade da enzima hepática fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) destes animais foi significativamente aumentada em relação aos ratos normonutridos. Em um outro estudo Desai et al (1997) mostraram que o peso do fígado de ratos com 11 meses de idade alimentados com uma ração normoprotéica, cujas mães receberam uma dieta com 8% proteína durante a gestação e lactação não foi diferente do grupo normonutrido. A recuperação no tamanho do fígado não necessariamente indica uma normalização da função hepática: uma diminuída atividade da enzima hepática glicocinase foi observada nas duas idades estudadas (21 dias e 11 meses) deste grupo. Enquanto que a atividade da PEPCK foi significativamente aumentada, em ambas idades, no grupo que sofreu uma restrição de crescimento intra-uterino. Os autores também acharam um aumento de 88% na expressão do mRNA da PEPCK e uma diminuição de 54% na expressão do mRNA da glicocinase deste grupo.

As alterações no metabolismo de carboidratos observadas em roedores em consequência da desnutrição protéica durante períodos críticos do crescimento e do

desenvolvimento foram mantidas apesar do efeito regulatório esperado em consequência da ingestão de uma dieta normoprotéica e normocalórica. Além disso, em ratos filhotes cujas mães sofreram uma restrição de proteína na dieta, durante o período gestacional e lactacional, a alteração na atividade das enzimas chaves do metabolismo da glicose permanece suscetível à regulação na vida adulta. O principal efeito da programação (uma mudança permanente no filhote) não é prevenir controles endócrinos e metabólicos futuros, mas alterar o “set point” sobre este controle. Assim, Desai et al (1996) sugeriram que filhotes de ratos expostos a uma restrição de proteína na dieta durante o período gestacional e lactacional têm seu ponto de controle alterado na direção de uma nutrição pobre, uma vez que a atividade da enzima de utilização de glicose está diminuída e a atividade da enzima de produção de glicose está aumentada. É possível que estas mudanças podem ser parte integral do processo que pode realçar a sobrevivência do animal sob condições de má nutrição na vida pós-natal.

Ratos com três meses de idade, alimentados com uma ração normoprotéica a partir dos 21 dias de idade, cujas mães foram submetidas a uma dieta com 8% de proteína durante o período gestacional e lactacional apresentaram 3 vezes mais receptores de insulina e 5 vezes menos receptores de glucagon na membrana dos hepatócitos. Estes animais apresentaram uma resistência do fígado aos efeitos do glucagon em estimular a produção de glicose, talvez pelas alterações dos números de receptores tanto de insulina como de glucagon observadas (Ozanne et al, 1996_a).

Hales et al (1996) mostraram que ratos com três meses de idade alimentados após o desmame com uma dieta normocalórica e normoprotéica, cujas mães receberam uma dieta com 8% de proteína durante o período gestacional e lactacional, foram mais tolerantes à glicose em relação aos ratos normonutridos. Possivelmente isto foi devido a uma aumentada sensibilidade à insulina, uma vez que as concentrações de insulina plasmáticas foram reduzidas (Shepherd et al, 1997). No entanto, com a idade, a tolerância à glicose destes animais se deteriora mais rapidamente (Hales et al, 1996) e posteriormente eles desenvolvem DM II (Petry et al, 2001). A base do mecanismo desta perda de tolerância à glicose, dependente da idade, ainda é desconhecida. Porém, em ratos machos desnutridos isto parece resultar da resistência à insulina, visto que as concentrações de insulina foram

maiores, enquanto que em fêmeas parece resultar da deficiência de insulina (Hales et al, 1996).

Como pode ser observado em nossos resultados a concentração hepática de glicogênio (Tab. 5) do grupo hipoprotéico normolipídico, aos 60 dias de idade, foi 45,0% maior; a síntese hepática de glicogênio a partir de [U-¹⁴C]-frutose e de [U-¹⁴C]-glicerol (Tab. 5) foram 15,5 e 50,0% maiores respectivamente; e a glicemia (Tab. 6) foi 22,5% menor em relação ao grupo normoprotéico normolipídico, mostrando que o grupo que foi submetido à desnutrição protéica desde o período gestacional até os 60 dias de idade apresentou maior sensibilidade à insulina. Esses resultados podem ser explicados a partir dos achados encontrados por Desai, et al (1997) e Ozzane, et al (1996_a).

Quando estudamos estes mesmos parâmetros em ratas que foram submetidas à desnutrição protéica desde o período gestacional até os 4 meses de idade, observou-se que a concentração hepática de glicogênio (Tab. 10) do grupo desnutrido foi 171,9% e 254,5% maior em relação ao grupo normonutrido e ao grupo que foi submetido à dieta comercial, respectivamente. A incorporação de glicose ao glicogênio hepático a partir de [U-¹⁴C]-glicerol (Tab. 10) foi 65% maior em relação ao grupo normonutrido. Observou-se, também, que a glicemia no grupo desnutrido não diferiu do grupo normonutrido aos 4 meses de idade como foi observado no grupo que foi submetido à desnutrição até os 2 meses.

O tecido muscular esquelético é considerado o maior sítio de captação de glicose pós-prandial (DeFronzo et al, 1992). Ozanne et al (1996_b) mostraram haver o dobro de receptores de insulina por miligrama de proteína muscular em ratos com três meses de idade, alimentado com ração normoprotéica a partir dos 21 dias de idade, cujas mães foram submetidas a uma dieta com 8% proteína durante a gestação e a lactação. O músculo tibial anterior deste grupo apresentou maior velocidade no transporte de glicose basal em relação ao grupo normonutrido. Quando o transporte de glicose foi medido em presença de baixa concentração de insulina (300 pM) o grupo que foi submetido à desnutrição gestacional e lactacional teve maior efeito no transporte de glicose em relação ao grupo normoprotéico.

O grupo que sofreu restrição de crescimento intra-uterino, não apresentou diferença no conteúdo de GLUT-4 em relação ao grupo normonutrido, entretanto, a distribuição sub celular de GLUT-4 foi 1:1,3 (membrana plasmática/membrana intracelular) no grupo desnutrido, e 1:6,6 no grupo normonutrido, o que pode ser relacionado à aumentada

sensibilidade à insulina no grupo que sofreu restrição de crescimento intra-uterino, contribuindo para a uma melhor tolerância à glicose.

Neste trabalho realizou-se captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo (Tab. 12), TTG (Fig. 4), TSI (Fig. 5) no grupo desnutrido para verificar o efeito da restrição protéica em períodos críticos do crescimento e do desenvolvimento sobre a sensibilidade a insulina e à tolerância a glicose. Observou-se que estas ratas apresentaram um aumento de 29,8% na captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo e uma glicemia diminuída aos 30, 60 e 120 minutos após a injeção i.p. de glicose (2 mg/g peso corporal) em relação ao grupo normonutrido, indicando melhor tolerância à glicose nestes respectivos tempos. No TSI (Fig. 5) aos 30 e 60 minutos a concentração de glicose plasmática do grupo desnutrido foi menor, indicando uma maior sensibilidade à insulina. Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados por DeFronzo et al (1992), Ozanne et al (1996_b) e Ozanne et al (2000_b).

EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO GESTACIONAL E LACTACIONAL ASSOCIADO À DIETA NORMOPROTÉICA (25%) E HIPERLIPÍDICA (42%) A PARTIR DO DESMAME ATÉ 4 E 8 MESES DE IDADE SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E DE LIPÍDEOS EM RATAS.

Holness et al (1999), utilizando ratos Wistar de 7 meses de idade, os quais foram submetidos a uma dieta com 9% e 20% de proteína (caseína) desde o período fetal até os 5 meses e após foram transferidos para uma dieta normoprotéica e hiperlipídica (22%) até completarem 7 meses, mostraram que o peso corporal do grupo desnutrido até os 5 meses de idade teve uma redução de 33% e 14% aos 21 e 150 dias, respectivamente. A diferença dos pesos entre os grupos normonutrido e desnutrido foi mantida durante a alimentação com uma dieta hiperlipídica até os 7 meses de idade.

Como pode ser observado em nossos resultados (Fig. 6) até os 120 dias de idade o grupo hipoprotéico hiperlipídico apresentou menor massa corporal em relação ao grupo normoprotéico hiperlipídico. Esta diferença foi mais pronunciada aos 21 dias de idade, onde a massa corporal do grupo hipoprotéico hiperlipídico foi 45,7% da massa corporal das ratas do grupo normoprotéico hiperlipídico. Observou-se, também, que entre 150 e 240 dias de idade não houve diferença na massa corporal entre eles. Neste período, a massa corporal do grupo hipoprotéico hiperlipídico foi maior do que o do grupo normoprotéico hiperlipídico, apesar desta diferença não ser estatisticamente diferente; a partir dos 150 dias de idade, o grupo hipoprotéico hiperlipídico ganha peso mais rapidamente que o grupo que não foi submetido à desnutrição protéica durante o período fetal e lactacional.

Observou-se, também, que o consumo de ração (Fig. 7) do grupo hipoprotéico hiperlipídico foi menor do 24 ao 90º dia em relação ao grupo normoprotéico hiperlipídico; dos 150 aos 180 dias é igual, mas aos 240 dias foi 11,4% maior do que o grupo normoprotéico hiperlipídico, demonstrando o efeito sinérgico da desnutrição em períodos críticos do crescimento e desenvolvimento, associado ao posterior consumo crônico de uma dieta hiperlipídica sobre a massa corporal.

Pode ser visto, também, em nossos resultados (Tab. 16) a relação do peso do fígado/100 g massa corporal no grupo hipoprotéico hiperlipídico, aos 4 meses de idade, foi maior em relação ao grupo normoprotéico hiperlipídico, mas quando o comparamos com o grupo que foi submetido à dieta comercial esta relação é menor. Observou-se que o grupo hipoprotéico hiperlipídico mostrou uma redução na relação do peso do fígado/100 g massa corporal aos 8 meses de idade, indicando uma recuperação do peso do fígado em relação ao peso corporal total e anulando o efeito da desnutrição durante a gestação e a lactação sobre

o peso deste órgão. Esta recuperação está associada ao consumo crônico de uma dieta hipercalórica após o desmame, até os 8 meses de idade.

A albumina é uma proteína plasmática sintetizada exclusivamente no fígado e suas concentrações variam em função da ingestão protéica.

Como pode ser observado (Tab. 18) a concentração de albumina no grupo hipoprotéico hiperlipídico, aos 4 meses de idade, foi menor em relação ao grupo normoprotéico hiperlipídico. No entanto, aos 8 meses, não se verifica diferença na concentração plasmática de albumina entre os grupos hiperlipídicos (submetidos ou não à desnutrição gestacional e lactacional) mostrando a importância da dieta (proteína) sobre a síntese de componentes essenciais para a homeostase corporal como a albumina.

Unger (2003) escreveu que os adipócitos, tradicionalmente, são conhecidos como um depósito passivo para o excesso de calorías armazenado como triglicerídeos (TG). Atualmente, no entanto, os adipócitos também são reconhecidos como uma complexa glândula endócrina que expressam e secretam, no mínimo, 17 hormônios polipeptídeos e citocinas, incluindo fator α de necrose tumoral (TNF)- α , que participa na manutenção da homeostase da glicose; leptina, que possui diferentes funções (central e periférica).

O Tecido adiposo tem um papel importante em tamponar o fluxo de ácidos graxos (AG) da circulação no período pós-prandial, análogo ao papel do fígado e do músculo esquelético em tamponar o fluxo de glicose pós-prandial. O tecido adiposo fornece sua ação tamponante por diminuir a liberação de ácidos graxos não esterificados (AGNE) para a circulação e por aumentar o “clearance” de triglicerídeos. Em particular, a rota de captação de AG [captação de AG (pelos adipócitos) liberados dos TG plasmáticos pela lipase lipoprotéica] tem uma contribuição chave no processo de tamponamento. Se esta ação tamponante é prejudicada, os tecidos extra-hepáticos e o fígado são expostos ao fluxo excessivo de lipídeos, podendo acumular estes na forma de TG, levando a resistência à insulina. Estes tecidos incluem além do fígado, o músculo esquelético e as células β pancreáticas. Esta última aonde em longo prazo terá como consequência diminuída secreção de insulina pelas células β .

Existem muitas evidências mostrando que a função do tecido adiposo está prejudicada em estados resistentes à insulina (Frayn, 2002). A habilidade da insulina em suprimir a liberação de ácidos graxos está prejudicada na obesidade e em outros estados

resistentes à insulina (Kim et al, 2000). Este prejuízo na função do tecido adiposo terá como consequência um tamponamento menos efetivo do fluxo de AG da circulação, manifestado como um aumento pós-prandial das concentrações plasmáticas de TG e AGNE.

É sabido que a distribuição do tecido adiposo é um fator importante na etiologia da resistência à insulina. Homens têm maior deposição de tecido adiposo em torno da cintura e a obesidade visceral está associada à resistência à insulina (Ferrannini 1995 e Ludvik et al, 1995). Desai et al (1997) comentaram que uma dieta hiperlipídica pode afetar a quantidade, a localização e o tipo de tecido adiposo, que pode contribuir para estes achados.

Como pode ser observado em nossos resultados (Tab. 17) a relação do tecido adiposo total e visceral/100 g massa corporal foi maior nos grupos hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos (nas duas idades estudadas) em relação grupo que foi submetido à dieta comercial, mostrando o efeito crônico de uma alimentação rica em lipídeo saturado sobre a deposição de tecido adiposo abdominal.

Ozanne et al (1997) mostraram que a PI3K estava mais ativa nos adipócitos do grupo que sofreu uma restrição do crescimento intra-uterino. O IRS-1 associado à atividade da PI3K apresentou níveis elevados nos adipócitos destes animais, sob condições basais e estimulada por insulina. No entanto, estes ratos apresentaram uma diminuição na expressão da subunidade catalítica p100 β da PI3K nos adipócitos. Shepherd et al (1998) têm observado em seus trabalhos que a PI3K é essencial para a mediação das numerosas ações metabólicas da insulina, incluindo a estimulação da captação da glicose e inibição da lipólise.

Petry et al (2000) mostraram um aumento na expressão dos receptores adrenérgicos β_1 e β_3 em adipócitos do epidídimo de ratos com três meses de idade cujas mães receberam uma dieta hipoprotéica (8% proteína) durante o período gestacional e lactacional em relação ao grupo normonutrido.

Como pode ser visto em nossos resultados (Tab. 22) as concentrações hepática e plasmática de triglicerídeos nos grupos hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos foram maiores (nas duas idades estudadas) em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial. Observou-se, também, que entre os grupos hiperlipídicos o grupo que foi submetido à desnutrição gestacional e lactacional apresentou maior concentração hepática

de triglicerídeos, aos 4 e 8 meses de idade. Quando comparamos as concentrações hepática e plasmática de triglicerídeos em função do desenvolvimento (4 e 8 meses) observou-se um aumento de 45,3% e 43,0%, respectivamente, no grupo Hipoprotéico Hiperlipídico aos 8 meses de idade.

Estes dados mostram que a desnutrição protéica durante períodos críticos do crescimento e do desenvolvimento, associado ao consumo crônico de uma dieta hiperlipídica produz esteatose hepática e hipertrigliceridemia.

Em nossos resultados (Tab. 23) foi observado que a concentração plasmática de HDL-colesterol, aos 4 meses de idade, e as concentrações plasmáticas de colesterol e de lipídeos totais, nas duas idades avaliadas, foram maiores nos grupos hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos. Quando comparamos a concentração plasmática de HDL-colesterol em função do desenvolvimento (4 e 8 meses) observou-se uma redução de 25,25% no grupo hipoprotéico hiperlipídico aos 8 meses de idade, mostrando o efeito da desnutrição em períodos críticos do crescimento e do desenvolvimento, associada à ingestão crônica de uma dieta rica em lipídeo, sobre o perfil lipídico.

A fosfatase alcalina é utilizada clinicamente, na rotina laboratorial como marcador de patologias hepáticas e ósseas. A atividade sérica aumentada da amilase e lipase são úteis para o diagnóstico de pancreatites.

Como pode ser visto em nossos resultados (Tab. 24) o grupo hipoprotéico hiperlipídico, aos 4 meses de idade, apresentou maior atividade da enzima amilase, comparado ao grupo que foi submetido à dieta comercial. Observou-se que a atividade da fosfatase alcalina foi maior nos grupos hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos, nas duas idades estudadas, em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial. Observou-se, também, um importante aumento na atividade da lipase (5 e 6 vezes) no grupo normoprotéico hiperlipídico, aos 8 meses de idade, em relação aos demais grupos experimentais, bem como com a idade de 4 meses.

Okura et al (2004) comentaram que a pancreatite secundária é causada por severa hipertrigliceridemia acompanhada por uma diminuição de quilomicra no plasma, e que marcada hipertrigliceridemia tem sido achada em 12 a 22% dos pacientes admitidos em hospital por pancreatite aguda. Embora a exata patogênese da pancreatite causada por hipertrigliceridemia permanece incerta, acredita-se que a pancreatite hiperlipidêmica seja

um resultado da irritação química no pâncreas por AG. Este composto é liberado pela lipase pancreática do núcleo e da superfície das quilomicras circulantes em altas concentrações nos capilares do pâncreas exócrino.

Mori et al (2003) comentaram que o D.M. aumenta os níveis das atividades plasmáticas de enzimas hepáticas como a alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST) e a fosfatase alcalina (ALP).

Os mecanismos pelos quais os níveis plasmáticos de ALT, AST e ALP estão aumentados no D.M. podem envolver a liberação aumentada destas enzimas dos tecidos, principalmente do fígado, devida ao estresse oxidativo e/ou a formação de produtos finais de glicação avançada.

Estudos prévios relataram que a restrição protéica isoladamente aumenta a ação periférica da insulina, mesmo com uma prejudicada secreção de insulina, como pode ser observado nos resultados do teste de tolerância à glicose TTG (Fig. 4) e do teste de sensibilidade à insulina TSI (Fig. 5) do nosso trabalho. Porém, uma dieta rica em lipídio leva a um modesto prejuízo na ação periférica da insulina sem um prejuízo da tolerância a glicose, devido à aumentada secreção de insulina (Holness, 1996). No entanto, a exposição crônica das duas intervenções dietéticas resulta em uma interação sinérgica, levando a um marcado prejuízo na ação periférica da insulina, associado, então, com uma diminuída resposta secretora da mesma resultando na intolerância à glicose.

Para observar tal efeito, realizou-se: captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo (Tab. 20), medida da glicemia (Tab. 21), TSI (Fig. 8) e TTG (Fig. 9) em ratas com 8 meses de idade que foram submetidas à desnutrição gestacional e lactacional associado à dieta normoprotéica (25%) e hiperlipídica (42%).

Como pode ser visto (Tab. 20) a captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo foi menor nos grupos hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial. Mas apenas o grupo hipoprotéico hiperlipídico apresentou uma diminuição significativa (15,35%) na captação de 2-deoxiglicose comparado ao grupo que foi submetido à dieta comercial.

A glicemia (Tab. 21) nos grupos hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos, aos 4 meses de idade, foi superior em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial. Observou-se que, aos 8 meses de idade, a concentração plasmática de glicose do grupo

hipoprotéico hiperlipídico foi 11,8% maior em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial. Quando comparamos a concentração plasmática de glicose em função do desenvolvimento (4 e 8 meses) observou-se um aumento de 13,2% neste parâmetro, aos 8 meses de idade, no grupo hipoprotéico hiperlipídico.

No TSI (Fig. 8) foi observado que os grupos hipoprotéico e normoprotéico hiperlipídicos apresentaram um aumento na glicemia, no estado de jejum, em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial. No entanto, este aumento foi estatisticamente diferente apenas em relação ao grupo normoprotéico hiperlipídico.

No TTG (Fig. 9) o grupo hipoprotéico hiperlipídico apresentou uma glicemia aumentada, aos 30 e 60 minutos, em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial, indicando uma intolerância à glicose, nestes respectivos tempos.

Estes resultados estão de acordo com Holness et al (1996) mostrando um sinergismo da exposição crônica das duas intervenções dietéticas, que levou a um prejuízo na ação periférica da insulina, resultando em intolerância à glicose.

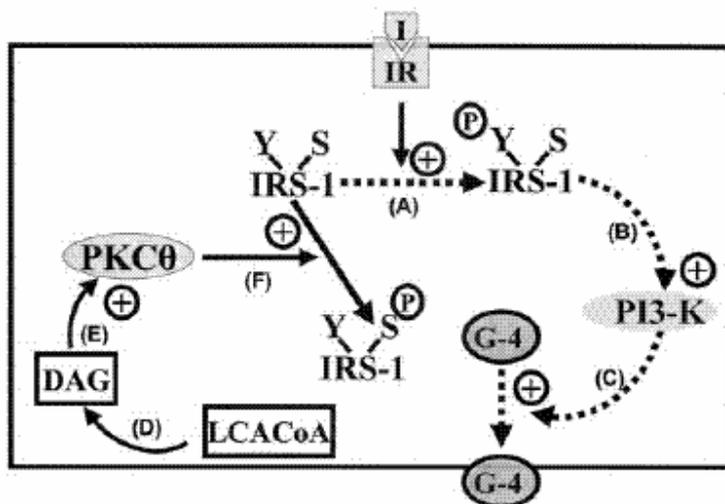
McGarry (2002) em seu artigo de revisão relatou que os TG podem estar agindo como marcadores substitutos para alguns produtos derivados dos AG, tais como espécies de acil-CoA de cadeia longa (acil-CoA CL), na captação de glicose estimulada por insulina.

Ellis et al (2000) avaliaram um grupo de indivíduos com vários graus de tolerância à glicose e acharam uma forte correlação negativa entre sensibilidade à insulina corporal durante um clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico e o conteúdo de acil-CoA CL no miócito esquelético medido por ^1H MRS.

Ye et al (2001) encontraram uma diminuída captação de glicose estimulada por insulina no músculo esquelético de ratos submetidos à dieta hiperlipídica, eles também acharam um marcado aumento nos níveis de TG plasmáticos e um aumento de acil-CoA CL no miócito esquelético.

Evidências mostraram que o acil-CoA CL interfere na captação de glicose estimulada por insulina interrompendo a cascata de sinalização de insulina que normalmente leva ao movimento dos transportadores de glicose (GLUT)-4 de um compartimento intracelular para a superfície da célula muscular (Fig. 10).

Figura 10: Captação de glicose estimulada por insulina no músculo esquelético de ratos no estado de jejum de 18 a 24 horas.



Fonte: Dresner, A et al (1999) e Laybutt, D. R. et al (1999)

Na ausência de ácidos graxos, quando a insulina (I) liga-se ao seu receptor (IR), ela gera a seguinte seqüência de eventos (flechas pontilhadas): A: fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) em um resíduo de tirosina; B: ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), e C: translocação do transportador de glicose responsivo a insulina (GLUT-4) para a membrana plasmática. Na presença de acil-CoA de cadeia longa (LcaCoA), a cascata de sinalização da insulina segue uma rota diferente (flechas sólidas): D: geração de um pool de diacilglicerol (DAG), E: ativação da proteína quinase C-θ (PKC θ) e a fosforilação do IRS-1 em um resíduo de serina.

Este processo envolve uma seqüência de reações cuja ligação da insulina ao seu receptor causa a fosforilação do (IRS)-1. Isto leva à ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), um ponto chave na translocação do GLUT 4 para a membrana plasmática (Shulman, 2000 e Laybutt et al, 2000). Kim et al (1999) e Kim et al (2000) mostraram a partir de músculo de indivíduos obesos resistentes à insulina (com ou sem DM) e de ratos Zucker respectivamente, níveis reduzidos de fosforilação do resíduo de tirosina do IRS-1 e

de atividade da PI3K. Com este pensamento, Griffin et al (1999) infundiu lipídeos e heparina em ratos normais para aumentar os níveis de AG livres circulantes por cinco horas antes de realizar um clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico. Como esperado, a infusão de lipídeos causou uma redução de 40-50% na oxidação muscular de glicose e na síntese de glicogênio por um transporte de glicose prejudicado. Isto foi acompanhado por uma diminuição significativa na fosforilação do resíduo de tirosina do IRS-1, por uma redução de 50% na atividade da PI3K associada ao IRS-1 e por um aumento de até 4 vezes proteína quinase C θ (PKC)- θ ativa ligada a membrana. A partir destes achados os autores proporam uma hipótese de que uma elevada concentração de acil-CoA CL na célula muscular gera um pool de diacilglicerol, que então ativa uma serina quinase (possivelmente PKC- θ). A fosforilação resultante do IRS-I em um resíduo de serina interfere com sua habilidade em recrutar e ativar a PI3K. Assim, temos uma perda do estímulo para a translocação do GLUT 4 para a superfície da célula e então uma captação de glicose estimulada por insulina prejudicada. Consistente com esta noção, Bell et al (2000) acharam que a rápida reversão da resistência à insulina muscular em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica depois de uma única refeição rica em carboidratos estava associada com uma diminuição nos níveis de acil-CoA CL e uma perda da atividade da PKC- θ ligada à membrana.

Goldstein et al (1998) relataram que um dos mecanismos para os defeitos na cascata de fosforilação do receptor de insulina, que ocorre na obesidade, pode ser a atividade e a expressão aumentada de várias proteínas tirosina fosfatases (PTPs), que defosforilam e assim interrompem a sinalização propagada através de eventos de fosforilação tirosil. Alguns dados indicam que no mínimo três PTPs estão aumentadas na sua expressão e/ou ativação no músculo e tecido adiposo de roedores e seres humanos obesos.

CONCLUSÕES

Dos resultados encontrados e discutidos anteriormente, pode-se concluir que:

A desnutrição pré-gestacional, gestacional e lactacional até 60 dias de idade ocasionou:

- um aumento na concentração de glicogênio hepático em relação ao grupo normoprotéico e normolipídico;
- um aumento na síntese de glicogênio hepático a partir de [U-¹⁴C]-frutose e de [U-¹⁴C]-glicerol em relação ao grupo normoprotéico e normolipídico;
- uma diminuição na concentração de glicose plasmática em relação ao grupo normoprotéico e normolipídico.

A desnutrição crônica desde o período gestacional até os 4 meses de idade ocasionou:

- uma diminuição no peso corporal, em todas as idades avaliadas, em relação ao grupo normonutrido;
- uma diminuição no consumo de ração até os 90 dias de idade em relação ao grupo normonutrido;
- um aumento na relação do peso do fígado/100 g massa corporal em relação ao grupo normonutrido;
- uma diminuição na concentração plasmática de albumina em relação ao grupo normonutrido;
- um aumento na concentração hepática de triglicerídeos em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial;
- um aumento na concentração hepática de glicogênio em relação aos demais grupos experimentais estudados;
- um aumento na incorporação de glicose ao glicogênio hepático a partir de [U-¹⁴C]-glicerol em relação ao grupo normonutrido;
- um aumento na concentração plasmática de colesterol total e de lipídeos totais em relação aos demais grupos experimentais estudados;

- um aumento na concentração plasmática de HDL-colesterol em relação ao grupo normonutrido;
- um aumento na atividade da amilase em relação ao grupo normonutrido;
- um aumento na atividade da lipase em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial;
- um aumento na atividade da fosfatase alcalina em relação aos demais grupos experimentais estudados;
- um aumento na captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo em relação ao grupo normonutrido;
- uma maior sensibilidade à insulina e tolerância a glicose em relação ao grupo normonutrido.

A associação da desnutrição durante o período gestacional e lactacional ao consumo de uma dieta normoprotéica (25%) e hiperlipídica (42%) a partir do desmame (21 dias de idade) até 4 e 8 meses de idade ocasionou:

- uma diminuição no peso corporal até os 120 dias de idade em relação ao grupo normoprotéico hiperlipídico;
- uma redução na relação do peso do fígado/100 g massa corporal aos 8 meses de idade, em relação ao valor encontrado aos 4 meses;
- um aumento na relação do tecido adiposo total e visceral/100 g massa corporal em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial;
- um aumento na concentração hepática de triglicerídeos, nas duas idades estudadas, em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial e em relação ao valor encontrado aos 4 meses;
- um aumento na concentração plasmática de triglicerídeos, nas duas idades estudadas em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial e em relação ao valor encontrado aos 4 meses;
- um aumento na concentração plasmática de colesterol total e de lipídeos totais em relação ao que foi submetido à dieta comercial;

- uma diminuição na concentração de HDL-colesterol aos 8 meses de idade, em relação ao valor encontrado aos 4 meses;
- uma diminuição na captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial;
- um aumento na glicemia aos 8 meses de idade, em relação ao valor encontrado aos 4 meses;
- uma intolerância à glicose e uma insensibilidade à insulina em relação ao grupo que foi submetido à dieta comercial.

Conclusão Geral:

Podemos concluir que o genótipo econômico (Nell, 1962), a desnutrição durante a gestação e lactação, uma dieta hiperlipídica e estilo de vida sedentário são fatores que contribuem para o desenvolvimento da obesidade e conseqüentemente da resistência à insulina e DM II.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barker, D. J. P. (1991) The intrauterine origins of cardiovascular and obstructive lung disease in adult life. The Marc Daniels Lecture 1990. *J. Roy. Coll. Phys. Lond.* 25: 129-132

Barker, D. J. P., Bull, A. R., Osmond, C., e Simmonds, S. J. (1990) Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *Br. Med. J.* 30: 259-262

Barker, D. J. P., e Osmond, C. (1986) Infant mortality, childhood nutrition and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* I: 1077-1081

Barker, D. J. P., Hales, C. N., Fall, C. H. D., Osmond, C., Phipps, K., e Clark, P. M. S. (1993) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36: 62-67

Barker, D. J. P., Meade, T. W., Fall, C. H. D., et. al. (1992) Relation of fetal and infant growth to plasma fibrinogen and factor VII concentrations in adult life. *Br. Med. J.* 304: 148-152

Barker, D. J. P., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D., e Wadsworth, M. E. J. (1989a) Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Br. Med. J.* 298: 564-567

Barker, D. J. P., Winter, P. D., Osmond, C., Margetts, B., e Simmonds, S. J (1989b) Weight in infancy and death from ischaemic disease. *Lancet* II: 577-580

Bell, K. S., Schmitz-Peiffer, C., Lim-Fraser, M., Biden, T. J., Cooney, G. J., e Kraegen, E. W. (2000) Acute reversal of lipid-induced muscle insulin resistance is associated with rapid alteration in PKC- θ localization. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* 279: E1196-E1201

Benediktsson, R., Lindsay, R. S., Noble, J., Seckl, J. R., e Edwards, C. R. (1993) Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* 341: 339-341

Berney, D. M., Desai, M., Palmer, D. J., Greenwald, S., Brown, A., Hales, C. N., e Berry, C. L. (1997) The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. *J. of Pathol.* 183: 109-115

Brown, R. W., Diaz, R., Robson, A. C., Kotelevtsev, Y. V., Mullins, J. J., Kaufman, M. H., e Seckl, J. R. (1996) The ontogeny of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. *Endocrinology* 137: 794-797

Chakravarthy, M. V., e Booth, F. W. (2004) Eating, exercise, and “thrifty” genotypes: connecting the dots toward na evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J. Appl. Physiol.* 96: 3-10

Challis, J. R. G., Sloboda, D., Matthews, S. C., Holloway, A., Alfraid, N., Howe, D., Fraser, M., Moss, T. J. M., e Newnham, J. M. (2001) The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal axis, parturition and posnatal health. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 185: 135-144

Clarke, K. A., Ward, J. W., Forhead, A. J., Giussani, D. A., e Fowden, A. L. (2002) Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in ovine placenta by fetal cortisol. *J. of Endocrinol.* 172: 527-534

Cole, T. J., Blendy, J. A., Monaghan, A. P., Schmid, W., Aguzzi, A., e Schutz, G. (1995) Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids* 60: 93-96

DeFronzo, R. A., Bonadonna, R. C., e Ferrannini, E. (1992) Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-368

Desai, M., Byrne, C. D., Meeran, K., Martenz, N. D., Bloom, S. R., e Hales, C. N. (1997) Regulation of hepatic enzymes and insulin levels in offspring of rat dams fed a reduced-protein diet. *Am. Physiol. Soc.* G899-G904

Desai, M., Crowther, N. J., Lucas, A., e Hales, C. N. (1996) Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br. J. Nutr.* 76: 591-603

Diaz, R., Brown, R. W., e Seckl, J. R. (1998) Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *J. Neurosci.* 18: 2570-2580

Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M. E., Dufour, S., Cline, G. W., Slezak, L. A., Andersen, D. K., Hundal, R. S., Rothman, D. L., Petersen, K. F., e Shulman, G. I. (1999) Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1 associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Clin. Invest.* 103: 153-259

Ellis, B. A., Poynten, A., Lowy, A. J., Furler, S. M., Chisholm, D. J., Kraegen, E. W., e Cooney, G. J. (2000) Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279: E554-E560

Ferrannini, E. (1995) Physiological and metabolic consequences of obesity. *Metabolism* 44: 15-17

Finegood, D. T., Scaglia, L., e Bonner-Weir, S. (1995) Dynamics of β -cell mass in the growing rat pancreas. *Diabetes* 44: 249-256

Forsdahl, A. (1977) Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br. J. Prev. Soc. Med.* 31: 91-95

Fowden, A. L. (2003) The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta* 24: 813-812

Fowden, A. L., e Forhead, A. J. (1998) Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long term consequences of the life insurance? *Proc. of the Nutr. Soc.* 57: 113-122

Fowden, A. L., e Forhead, A. J. (2001) The role of hormones in intrauterine development. In *Lung Biology in Health and Disease*, Vol 151, p. 199-228. Ed. Barker, D. J. P. New York: Marcel Dekker.

Fowden, A. L., e Forhead, A. J. (2004) Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* 127: 515-526

Fowden, A. L., e Hill, D. J. (2001) Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Br. Med. Bulletin* 60: 123-142

Frayn, K. N. (2002) Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 45: 1201-1210

Godfrey, K., Barker, D. J., Robinson, S., e Osmond, C. (1997) Maternal birthweight and diet in pregnancy in relation to the infant's thinness at birth. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 104: 663-667

Godfrey, K., Robinson, S., Barker, D. J., Osmond, C., e Cocks, V. (1996) Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *Br. Med. J.* 312: 410-414

Goland, R. L., Jozak, S., Warren, W. B., Conwell, I. M., Stark, R. I., e Tropper, P. J. (1993) Elevated levels of umbilical cord plasma corticotropin-releasing hormone in growth-retarded fetuses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77: 1174-1179

Goldstein, B. J., Ahmad, F., Ding, W., Li, P. M., e Zhang, W. R. (1998) Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol. Cell. Biochem.* 182: 91-99

Griffin, M. E., Marcucci, M. J., Cline, G. W., Bell., K., Barucci, N., Lee, D., Goodyear, I. J., Kraegen, E. W., White, M. F., e Shulman, G. I. (1999) Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C- θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270-1274

Hales, C. N., Barker, D. J. P., Clark, P. M. S., et. al. (1991) Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64 years. *Br. Med. J.* 303: 1019-1022

Hales, C. N., Desai, M., Ozanne, S. E., e Crowther, N. J. (1996) Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 341-350

Hales, C. N., e Barker, D. J. P. (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35: 595-601

Hellerstrom. C., e Swenne, I. (1985) Growth patterns of pancreatic islets in animals. In: Volk, B. W., Arquila, M. D. (eds) *The Diabetic Pancreas*. Plenum Press, New York, p. 53-59

Hiles, I. D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M. J., et. al. (1992) Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kD catalytic subunit. *Cell.* 70: 419-429

Hill, D. J., e Hogg, J. (1991) Growth factor control of pancreatic β cell hyperplasia. In: Herington, A. (ed) *Clinical Endocrinology and Metabolism*. Bailliere Tindall, London, p. 689-698

Hill, D. J., Petrik, J., Arany, E., McDonald, T. J., e Delovitch, T. L. (1999) Insulin-like growth factors prevent cytokine-mediated cell death in isolated islets of langerhans from pre-diabetic NOD mice. *J. Endocrinol.* 161: 153-165

Hogg, J., Han, V. K. M., Clemmons, D. R. e Hill, D. J. (1993) Interactions of glucose, insulin-like growth factor (IGFs) and IGF binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal islets of Langerhans. *J. Endocrinol.* 138: 401-412

Hogg, J., Hill, D. J., e Han, V. K. M., (1994) The ontogeny of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein gene expression in the rat pancreas. *J. Mol. Endocrinol.* 13: 49-58

Holness, M. J. (1996) Impact of early growth retardation on glucoregulatory control and insulin action in mature rats. *Am. J. Physiol.* 270: E946-E954

Holness, M. J., e Sugden, M. C. (1996) Subotimal protein nutrition in early life later influences insulin action in pregnant rats. *Diabetologia* 39: 12-21

Holness, M. J., e Sugden, M. C. (1999) Antecedent protein restriction exacerbates development of impaired insulin action after high-fat feeding. *Am. Physiol. Soc.* E85-E93

Holness, M. J., e Sugden, M. C. (2001) Antecedent protein restriction and high-fat feeding interactively sensitise the leptin response to elevated insulin. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 173: 53-62

Holness, M. J., Langdown, M. L., e Sugden, M. C. (2000) Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of type 2 diabetes mellitus. *Biochem. J.* Aug. 1; 349 Pt 3: 657-65

Hu P., Mondino, A., Skolnik, E. Y., e Schlessinger, J. (1993) Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidyl inositol 3-kinase and identification of binding site to p85. *Mol. and Cell. Biol.* 13: 7677-7688

Kaung, H. L. (1994) Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev. Dyn.* 200: 163-175

Kim, Y-B., Nikoulina, S. E., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., e Kahn, B. B. (1999) Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 104: 733-741

Kim, Y-B., Peroni, O. D., Franke, t. F., e Kahn, B. B. (2000) Divergent regulation of Akt 1 and Akt 2 isoforms in insulin target tissues of obese Zucker rats. *Diabetes* 49: 847-856

Kitraki, E., Kittas, C., e Stylianopoulou, F. (1997) Glucocorticoid receptor gene expression during rat embryogenesis. An *in situ* hybridization study. *Differentiation* 62: 21-31

Krisman, C. R. (1962) A method for calorimetric estimation of glycogen with iodine. *Analyt. Biochem.* 4: 17-23

Law, C. M. (1996) Fetal and infant influences on non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetic Med.* 13: S49-S52

Laybutt, D. R., Schmitz-Peiffer, C., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Biden, T. J., e Kraegen, E. W. (1999) Muscle lipid accumulation and protein kinase C activation in the insulin-resistant chronically glucose-infused rat. *Am. J. Physiol.* 277: E1070-E1076

Liggins, G. C. (1994) The role of cortisol in preparing the fetus for birth. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 141-150

Lindsay, R. S., Lindsay, R. M., Waddell, B. J., e Seckl, J. R. (1996) Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia* 39: 1299-1305

Lucas, A. (1991) Programming by early nutrition in Man. In: Bock, G. R., Whelan, J. (ed) The childhood environment and adult disease. Ciba Found. Symp. John Wiley & Sons, Chichester, England, p. 38-50

Ludvik, B., Nolan, J. J., Sacks, D., e Olefsky, J. (1995) Effect of obesity on insulin resistance in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetes* 44: 1121-1125

Madani, S., Prost, J., e Belleville, J. (2000) Dietary protein level and origin (casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma lipid transport, and antioxidative defense status in the rat. *Nutrition* 16: 368-375

Maison, P., Byrne, C. D., Hales, C. N., (2000) Wareham, N. J. Hypertension and its treatment influence changes in nonesterified fatty acid concentrations: a link between the sympathetic nervous system and the matabolic syndrome? *Metabolism* 49: 81-87

Massa, L., Cortizo, A. M. e Gagliardino, J. J. (1997) Insulin-like growth factor binding proteins from adult-hamster pancreatic islets: influence of glucose concentration. *Diabetes Metab.* 23: 417-423

McCance, R. A. (1976) Critical periods of growth. *Proc. Nutr. Soc.* 35: 309-313

McCance, R. A., e Widdowson, E. M. (1974) The determinants of growth and form. *Proc. R. Soc. London Ser. B: Biol. Sci.* 185: 1-17

McGarry, J. D. (2002) Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes. *Diabetes* Vol. 51: 7-18

Morgane, P. J., Mokler, D. J., e Galler, J. R. (2002) Effects of protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. and Biobeh. Rev.* 26: 471-483

Mori, D. M., Baviera, A. M., Ramalho, L. T. O., Vendramini, R. G., Brunetti, I. L., e Pepato, M, T. (2003) Temporal response pattern of biochemical analytes in experimental diabetes. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38: 183-191

Mune, T., Rogerson, F. M., Nikkila, H., Agarwal, A. K., e White, P. C. (1995) Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat. Genet.* 10: 394-399

Neel, J. V. (1962) Diabetes mellitus a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? *Am. J. Hum. Genet.* 14: 352-353

Okura, Y., Hayashi, K., Shingu, T., Kajiyama, G., Nakashima, Y., e Saku, K. (2004) Diagnostic evaluation of acute pancreatitis in two patients with hypertriglyceridemia. *World J. Gastroenterol.* 10 (24): 3691-3695

Ozanne, S. E., Dorling, M. W., Wang, C. L., e Petry, C. J. (2000_a) Depot-specific effects of early growth retardation on adipocyte insulin action. *Horm. Metab. Res.* 32: 71-75

Ozanne, S. E., Nave, B. T., Wang, C. L., Shepherd, P. R., Prins, J., e Smith, G. D. (1997) Poor fetal nutrition causes long term changes in expression of signalling components in adipocytes. *Am. J. of Physiol.* 273: E46-51

Ozanne, S. E., Olsen, G. S., Hansen, L. L., Nave, B. T., Hartil, K., e Mosthaf, L. (2000_b) Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetologia* 43, suppl. 1, 674

Ozanne, S. E., Smith, G. D., Tikerpa, J., e Hales, C. N. (1996_a) Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Am. Physiol. Soc.* E559-E564

Ozanne, S. E., Wang, C. L., Coleman, N., e Smith, G. D. (1996_b) Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am. Physiol. Soc.* E1128-E1134

Ozanne, S. E., Wang, C. L., Dorling, M. W., e Petry, C. J. (1999) Dissection of the metabolic actions of insulin in adipocytes from early growth-retarded male rats. *J. of Endocrinol.* 162: 313-319

Petrik, J., Arany, E., McDonald, T. J., e Hill, D. J. (1998) Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology* 139: 2994-3004

Petry, C. J., Dorling, M. W., Wang, C. L., Pawlak, D. B., e Ozanne, S. E. (2000) Catecholamine levels and receptor expression in low protein rat offspring. *Diabetic Med.* 17: 848-853

Petry, C. J., e Hales, C. N. (1999) Intrauterine development and its relationship with type 2 diabetes mellitus. In: Hitman, G. A. (Ed.), *Type 2 Diabetes: Prediction and Prevention*. Wiley, Chichester, UK, p. 153-168

Petry, C. J., Ozanne, S. E., e Hales, C. N. (2001) Programming of intermediary metabolism. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 185: 81-91

Purdy, L. P., e Metzger, B. E. (1996) Influences of the intrauterine metabolic environment on adult disease: what may we infer from size at birth? *Diabetologia* 39: 1126-1130

Ravelli, A. C., Van Der Meulen, J. H. P., Michels, R. P. J., Osmond, C., Barker, D. J. P., Hales, C. N. E Bleker, O. P. (1998) Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 351: 173-177

Reaven, G. M. (1995) The fourth Musketeer – from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia* 38: 3-13

Reaven, G. M., Bernstein, R., Davis, B. e Olefsky, J. M. (1976) Non-ketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? *Am. J. Med.* 60: 80-88

Richard, A., e McPherson, M. D. Specific Proteins. In: Henry, J. B. [Org.] *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* 19ª edição W.B. Saunders Company p. 1556 (1975)

Rubenstein, A. H. Anatomy, Developmental Biology, and Pathology of the Pancreatic Islets. In: DeGroot, L. J. e Jameson, J. L. [Org.] *Endocrinology* 4ª edição W.B. Saunders Company Vol. I p. 1-968 (2001)

Scaglia, L., Cahill, C. J., Finegood, D. T., e Bonner-Weir, S. (1997) Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138: 1736-1741

Seckl, J. R. (2001) Glucocorticoid programming of the fetus: adult phenotypes and molecular mechanisms. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 185: 61-71

Seckl, J. R., e Olsson, T. (1995) Glucocorticoid hypersecretion and the age-impaired hippocampus: cause or effect? *J. Endocrinol.* 145: 201-211

Seckl, J. R., Nyirenda, M. J., Walker, B. R., e Chapman, K. E. (1999) Glucocorticoids and fetal programming. *Biochem. Soc. Trans.* 27: 74-78

Shepherd, P. R., Crowther, N. J., Desai, M., Hales, C. N., e Ozanne, S. E. (1997) Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br. J. Nutr.* 78: 121-129

Shepherd, P. R., Withers, D. J., e Siddle, K. (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333: 471-490

Shulman, G. I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106: 171-176

Sibley, C., Glazier, J., e D'Souza, S. (1997) Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Experimental Physiol.* 82: 389-402

Snoeck, A., Remacle, C., Reusens, B., e Hoet, J. J. (1990) Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol. Neonate* 57: 107-118

Strauss, R. S. (1997) Effects of intrauterine environment on childhood growth. *Br. Med. Bull.* 53: 81-95

Unger, R. G. (2003) The Physiology of Cellular Liporegulation. *Annu. Rev. Med.* 65: 333-47

Widdowson, E. M. (1976) Cellular growth and fuction. *Proc. Nutr. Soc.* 35: 357-362

Wilson, M. R., e Hughes, S. J. (1997) The effects of maternal protein deficiency during pregnancy and lactation on glucose tolerance and pancreatic islet function in adult rat offspring. *J. Endocrinol.* 154: 177-185

Winick, M., e Noble, A. (1996) Cell responses in rats during malnutrition at various ages. *J. Nutr.* 89: 300-306

Ye, J-M., Doyle, P. J., Iglesias, M. A., Watson, D. G., Cooney, G. J., e Kraegen, E. W. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats. *Diabetes* 50: 411-417