

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Programação metabólica: estudo de parâmetros indicadores de resistência à insulina e espécies reativas de oxigênio em ratos.

Mestrando: Simone da Luz Silveira

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz dos Santos Perry

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2010.

De um certo ponto adiante não há mais retorno.

Esse é o ponto que deve ser alcançado.

Franz Kafka.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus - luz interior, força pulsante, consciência e inconsciência.

À vida, terra fértil de sorrisos e prantos. Academia máxima.

Aos elementos da natureza em que me refugio e com os quais me encanto. *“Quando uma árvore cai na floresta, ela faz barulho se não houver ninguém para escutar?”*

Ao meu pai, pelo esforço e dedicação diária para que eu e meus irmãos pudéssemos estudar e sermos felizes com nossas escolhas. Pelo exemplo de ética e honestidade com que nos criou e guia sua vida. Gratidão pela maneira liberta que procurou me criar, ensinando os melhores caminhos a seguir, mas nunca interferindo em minha escolha. Este livre arbítrio me fez, com certeza, uma pessoa melhor e mais segura. *“Não sou responsável pelo que os outros fizeram de mim, mas sou responsável com o que faço com aquilo que os outros fizeram de mim”*. Jean Paul Sartre.

A minha mãe pelas “marmitas” e por ajudar a meu pai; por ter aberto mão de muitas colheitas por nós, sua família. *“Aquilo que não foi compreendido inevitavelmente reaparece; como um fantasma que não pode descansar até que o mistério tenha sido resolvido e o encanto quebrado”*. Sigmund Freud.

Às minhas amadas e eternas caçulinhas – Roberta e Renata – por me auxiliarem a desenvolver e aprimorar minha trilha. Por me incentivarem e acreditarem em mim e nos meus ideais. Gratidão por me abastecerem, por nutrirem meu espírito. *“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer dado a mim, dividir um planeta e uma época com vocês”*. Carl Sagan

Às pessoas que de alguma maneira fizeram a diferença em minha vida e me auxiliaram a compor, de alguma maneira, este trabalho: Vó Filinha, Vó Zaira, Vô Vilmar, tio Ivan, tia De, Maria Flávia Marques Ribeiro, Susie Andrade, Viviana Sthanke, Beatriz Iraí Stock,

Alexandre Magno, Ana Cristina Mariante. *“Existem pessoas... e pessoas de quem não nos esquecemos tão fácil pois elas nos ajudam a ajudar outros, a ajudar a nós mesmos, a manter o ritmo do fluxo em perfeito funcionamento..”*.

Ao André, um presente que ganhei nestes últimos 5 anos, pela contribuição, partilha, imensa paciência, amor e cuidado com que conduz nossa relação. *“Sucedeu-se, por uma destas sutilezas do destino...e, a mim...coube aceitar o dow hill”*.

Ao Prof. Marcos Luiz Santos Perry pela oportunidade. *“A maior parte da filosofia foi inventada para acomodar nossos sentimentos às circunstâncias adversas, mas tanto as circunstâncias adversas como nossos pensamentos são efêmeros”*. Nietzsche

Às minhas colegas, amigas e confidentes: Ana Lúcia Hoefel, Fernanda Hansen, Lisiane Londero, Fernanda Sordi. *“O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. Você pode apenas ir em frente”*. (Provérbio Chinês).

A todo grupo lab 27. *“O pára-quedas é o único meio de transporte que ao enguiçar, chega-se mais rápido”*. Jô Soares.

Ao Tiago Leal Martins e Ricardo Pellegrino, do Departamento de Fisiologia, bem como seus orientadores, Roselis Silveira e Luiz Carlos Rios Kucharski. Pela agradável recepção e convivência e pelo enorme auxílio. Ao André Quincozes, que mesmo longe, auxiliou-me pacientemente. *A todos vocês por honrarem o adjetivo coleguismo*.

Agradeço aos funcionários do departamento: Sr. Waldemar, Odi, Cléia, Bebel, Cláudia, Patrícia e todo o pessoal do biotério, Rodrigo, Marcelo. *Vocês formam uma excelente equipe!*

ÍNDICE

PARTE I	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1.1 INTRODUÇÃO	5
1.1.1. DESNUTRIÇÃO	7
1.1.2 DESNUTRIÇÃO E SISTEMA NERVOSO.....	7
1.1.3 DIETA HIPERLIPÍDICA.....	8
1.1.4. RESISTÊNCIA À INSULINA	9
1.1.5. DIABETES MELLITUS TIPO II (DMII).....	10
1.1.6 GLICOTOXICIDADE, LIPOTOXICIDADE, ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO.	13
1.1.7 GLICONEOGÊNESE.....	16
1.1.8 DIETA HIPERLIPÍDICA, EROS/ERN, DMII E TECIDO NERVOSO	18
1.1.9 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Geral	21
2.2. Específicos	21
PARTE II	22
MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Desenho Experimental.....	23
3.2 Curva de crescimento:	25
3.3 Teste de tolerância à glicose (TTG).....	25
3.4 Insulina plasmática	25
3.5 Síntese de glicogênio hepático a partir de alanina (Glicogênese indireta)	25
3.6 Determinação da concentração de glicogênio hepático.....	25
3.7 Determinação de concentração de triglicerídeos hepáticos.	26
3.8 Determinação do colesterol plasmático	26
3.9 Determinação da quantidade de ácidos graxos livres	26
3.10 Determinação da atividade da PEPCK	26
3.11 Medida das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	27
3.12 Medida da Atividade das enzimas SOD e CAT	28

3.13 Determinação da produção intracelular de ROS (DCF).....	28
3.14 Quantificação da Glutathiona (GSH).....	28
3.15 Quantificação de Proteína.....	29
Análise Estatística.....	29
RESULTADOS	30
4.1 Parâmetros Corporais.....	30
4.2 Parâmetros Bioquímicos	32
4.3. Teste de Tolerância à Glicose.....	33
4.4. Atividade da PEPCK	34
4.5. Concentração de Glicogênio Hepático	35
4.6. Síntese de Glicogênio Hepático a partir de alanina	36
4.7. Efeito do tratamento dietético nas enzimas SOD e CAT no córtex cerebral.....	37
4.8. Conteúdo de GSH em córtex cerebral	38
4.9. Determinação da produção intracelular de ROS (DCF):.....	39
4.10. Medida das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS):.....	40
4.11. Efeito do tratamento dietético nas enzimas SOD e CAT no tecido hepático. .	41
4.12. Conteúdo de GSH em Tecido Hepático:	42
4.14. Medida das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	44
PARTE III	45
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÕES	56
PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

PARTE I

RESUMO

A desnutrição fetal ou perinatal pode programar risco de desordens metabólicas ao longo da vida. Fatores pós-natal podem modificar o fenótipo programado. Isto posto objetivamos verificar os efeitos de uma dieta hiperlipídica (50% de lipídios) sob a prole pós-desmame, de ratas submetidas à desnutrição durante a gestação ou lactação, sob parâmetros de resistência à insulina (RI) e estresse oxidativo (EO). Para tal utilizamos um modelo de desnutrição contendo 7% de proteína para os grupos experimentais, com dieta isocalórica ao grupo controle (25% de proteína). O desenho experimental foi composto de 4 grupos: DG-desnutrido durante a gestação (7% de proteína e 10% de lipídios), DL-desnutrido durante a lactação (7% de proteína e 10% de lipídios), N/H-normonutrido (25% de proteína e 10% de lipídios durante a gestação/lactação), C-controle (25% de proteína, 10% de lipídios e 65% de carboidratos durante os 4 meses de tratamento).

A rata-mãe do grupo DG foi substituída por lactante normonutrida. A rata-mãe do grupo DL recebeu dieta C até o parto e, durante o período de lactação (21 dias) essa foi substituída por dieta restrita em proteína. Os grupos, exceto C, receberam após seu período teste, dieta hiperlipídica (50% de lipídeos). Todos os grupos foram formados com n=8, exceto DG, com n=4. A fim de avaliar parâmetros de RI e EROs foram determinados: curva de crescimento (C.C.), teste de tolerância à glicose (TTG), massas dos fígados e tecido adiposo, insulina plasmática por radioimunoensaio, colesterol e triglicerídeos (Tg) plasmáticos e hepáticos utilizando kit enzimático e atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) hepático, bem como parâmetros de EO em fígado e córtex. Os resultados expressos em relação ao C.

O peso corporal total não apresentou diferença entre os grupos, no entanto, ao comparar o peso do tecido adiposo visceral e epididimal encontramos diferença significativa dos grupos DG e DL. No TTG, o grupo DG apresentou elevação significativa na glicemia basal, assim como grupos DG e DL no tempo de 60min., além disso, observou-se hiperinsulinemia no grupo DG. Os grupos tratados exibiram elevação estatística significativa dos Tg plasmáticos e hepáticos, bem como do colesterol hepático. Os grupos apresentaram diferença entre si quanto ao colesterol plasmático, mostrando relação mais acentuada nos grupos DL e DG, bem como nos parâmetros de avaliados de EO. Os resultados demonstram que a restrição protéica durante a gestação ou lactação induz a um estado de RI e EO, efeito amplificado por uma dieta hiperlipídica após a amamentação; ratificando a importância das condições intrauterinas e da qualidade da dieta pós-natal na gênese de doenças crônicas.

ABSTRACT

Fetal or perinatal undernutrition programmes risk of later metabolic disorders. Postnatal factors modify the programmed phenotype. To verify the effects of a high fat diet (50% fat) on the postweaning offspring of dams of rats that were submitted to malnutrition while gestation and lactation periods, under parameters of insulin resistance (IR) and oxidative stress (EO). We used a model of malnutrition composed of 7 % of protein for the experimental groups, with an isocaloric diet administered to the control group (25% protein). The experimental design was based on 4 groups: (DG) undernourished on the gestation (7% of protein and 10 % of fat), DL undernourished on the suckling (7% of protein and 10 % of fat), N/H diet control during gestation and lactation (25% of protein and 10 % of fat), C-control (25% of protein 10 % of fat and 65% of carbohydrate over the 4 months treatment).

The offspring of dams fed a low protein diet (LP) during pregnancy and then allowed to catch up by having the nursing dams fed a control (C). The DL group dams received a control diet until the delivery and during the suckling period it was changed by a low protein diet. The groups, except for the C group received, when their test period ended, a high fat (50% fat). In an attempt to evaluate IR and EROs parameters the body weight, the glucose tolerance test, biochemical parameters, body parameters, lipid peroxidation, the hepatic PEPECK's activity were runned, just like EO parameters of liver and brain cortex. The results were expressed relatively to C.

Addressing the total body weight, there were no difference between the groups, however, comparing the weight of adipose visceral e epididymal tissues, we found significant changes among DG and DL groups. On the GTT, the DG group has shown significant raising in the glycemia basal, just like occurred with the DG and DL groups in 60 minutes. Moreover, there was hyperinsulinemia on the DG group. The plasma and hepatic triglycerides of the working groups, just like its cholesterol hepatic suffered a significant increasing of the statistics scales. There were also differences in the cholesterol plasma between all the groups, showing a most stressed relationship when it comes to the DL and DG. The same occurred when the EO was assessed. The results show that the protein restriction during pregnancy or lactation leads to RI and EO, being this effect amplified by a high fat diet after the suckling period, assuring the importance of the intrauterine conditions and those concerning the quality of the postnatal diet all related to the origin of chronic diseases.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs: Produtos Finais de Glicação Avançada (do inglês *Advanced Glycation end Products*)

DM: Diabetes Mellitus

DMII: Diabetes Mellitus tipo II

RI: Resistência à Insulina

TNF- α : Fator Alfa de Necrose Tumoral

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

NF-kB: Fator Nuclear kB

PARP: Poli (ADP ribose) polimerase

CPT1 : Carnitina Palmitoil Transferase 1

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

EO: Estresse Oxidativo

ERNs: Espécies Reativas de Nitrogênio

RL: Radicais Livres

SOD: Superóxido Dismutase

CAT: Catalase

GPx: Glutathiona Peroxidase

GSH: Glutathiona Reduzida

TBARS: Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

C: Grupo Controle

NH: Grupo Normoprotéico

DG: Grupo Desnutrido na Gestação

DL: Grupo Desnutrido na Lactação

NASH: esteato hepatite não-alcoólica (do inglês Non-Alcoholic Steatohepatitis)

1.1 INTRODUÇÃO

A obesidade nos países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento cresce de maneira preocupante. Fatores como estilo de vida, dieta e genética contribuem para o desenvolvimento desta doença (BAINS et al, 2004). Além disso, pesquisadores têm discutido a relação entre o meio intra-uterino adverso e o desenvolvimento de doenças na vida adulta – “a origem fetal da doença do adulto”. Este fenômeno denominado “programação fetal” é descrito como um processo enquanto estímulo “in útero”, o qual estabelece uma resposta permanente no feto, conduzindo a um aumento da susceptibilidade a doenças na vida. No entanto, o meio, durante os períodos iniciais do desenvolvimento pós-natal, pode também “programar” funções (ARMITAGE, 2005). Com isso, tem sido proposto que o risco de desenvolvimento de desordens metabólicas na vida adulta é influenciado por fatores ambientais, já nos períodos iniciais do desenvolvimento.

A programação metabólica é um conceito definido por um processo em que um insulto, ocorrido em um período crítico de desenvolvimento, resulta em alterações permanentes na estrutura e/ou função de um órgão ou ação metabólica (PETRY & OZANNE, 2001). A relação entre a nutrição no período fetal e perinatal e a repercussão na vida adulta tem sido reconhecida há várias décadas.

Segundo Gluckman e Hansen (2004), quando a resposta adaptativa previsível é apropriada, como, por exemplo, um feto que passa por um período de desnutrição, faz adaptações para viver em um ambiente com restrição nutricional, desenvolvendo-se no mesmo meio, o fenótipo será normal; no entanto, quando descompassos ocorrem entre o meio gestacional e/ou lactacional e o meio jovem/adulto, como por exemplo, se o mesmo animal

que sofreu desnutrição gestacional e/ou lactacional, no pós-natal o meio é “normo” ou “hipernutrido” a resposta é negativa e doenças se manifestam.

Pouco se sabe a respeito das diferenças entre os efeitos da dieta materna sobre a prole, nos períodos de gestação e de amamentação. Grande parte dos protocolos inclui provisão de dieta para a mãe até o desmame. A dieta materna, durante o período de amamentação, no entanto, pode ser crucial, pois importante fase de maturação ocorre durante esse período (ARMITAGE, 2005).

Recentes evidências demonstram que doenças crônicas, como diabetes mellitus, hipertensão, aterosclerose e doenças cardiovasculares podem ter origem em alterações ocorridas no útero e durante o início da vida pós-natal (JOSHI et al, 2003). A epidemia de diabetes mellitus e obesidade nos países em desenvolvimento pode ser parcialmente explicada pela discrepância entre a má nutrição pré-natal e a abundância de alimentos no pós-natal (SIEMELINK M., 2002).

Mudanças funcionais induzidas por uma dieta hipoprotéica no período gestacional são persistentes e, na vida adulta, podem contribuir para o desenvolvimento da síndrome metabólica, caso a dieta após o período inicial de desenvolvimento seja normo ou hipercalórica (SPARRE et al, 2003).

Doença de Alzheimer (DA), obesidade, diabetes mellitus tipo II (DMII) e doença hepática não alcoólica (NAFLD)/esteato hepatite não-alcoólica (NASH), aumentaram drasticamente ao longo das últimas décadas. Há evidências crescentes de que a obesidade, DMII, e prejuízos cognitivos estão inter-relacionados (DE LA MONTE SM, 2009). No entanto, embora haja bastantes estudos epidemiológicos relacionando a obesidade e a ingestão excessiva de gordura com as crescentes taxas de DMII, NASH e prejuízo cognitivo (LAUNER LJ, 2007; DELGADO JS, 2008; NUGENT C, YOUNOSSI ZM, 2007; WANG

XP, DING HL, 2008), os dados experimentais atuais variam bastante dependendo do modelo avaliado (DE LA MONTE, SM, 2009)

Nas últimas décadas, muitos progressos têm sido feitos em direção ao entendimento da via de desenvolvimento dos sistemas fisiológicos e o impacto dos eventos iniciais da vida, inclusive a nutrição, nestes processos.

1.1.1. DESNUTRIÇÃO

Mediante estudos em roedores, pesquisadores demonstraram que a desnutrição protéico fetal resulta em déficit de crescimento intra-uterino e aumenta a incidência de doenças como diabete mellitus e síndrome metabólica (OZANNE et al, 2003).

Além disso, há pesquisas mostrando déficits cognitivos em animais e humanos que passaram por distúrbios dietéticos durante os períodos gestacional e lactacional. Há estudos mostrando prejuízo cognitivo secundário à desnutrição pré e pós-natal (MORGANE et al., 1993).

Etimologicamente, podem receber o conceito de desnutrição, estados determinados por deficiência quantitativa (energia) ou qualitativa (um ou mais nutrientes), consumo alimentar excessivo e mesmo certas doenças relacionadas a desvios da nutrição normal. Em nosso estudo, o termo desnutrição foi utilizado em relação à deficiência de proteína.

1.1.2 DESNUTRIÇÃO E SISTEMA NERVOSO

A desnutrição é responsável pela alteração de vários eventos maturacionais centrais resultando em anormalidades comportamentais, piora do funcionamento cognitivo e distúrbios no aprendizado e memória. Os efeitos dos insultos nutricionais no cérebro em

desenvolvimento são duradouros e levam a deficiências permanentes no aprendizado e comportamento (MORGANE et al, 1993). A maturação do SNC e o desenvolvimento da capacidade cognitiva dependem de três fatores essenciais: potencial genético do indivíduo, estímulo ambiental e nutrição adequada (MORGANE et al, 1993, KEHOE et al, 2001). Alterações no desenvolvimento cerebral pré-natal decorrente de quaisquer alterações destes fatores podem resultar em vários graus de prejuízo comportamental e disfunção cerebral. Atualmente, sabe-se que o contribuinte não genético mais importante para alterações permanentes do desenvolvimento cerebral fetal é a deficiência nutricional (GALLER, 2001; MORGANE et al., 2002).

1.1.3 DIETA HIPERLIPÍDICA

A dieta da sociedade ocidental é muito rica em calorias e principalmente em lipídeos. A obesidade é comumente associada com níveis elevados de ácidos graxos no plasma. Altos níveis de ácidos graxos no plasma têm emergido como a maior ligação entre a obesidade e a resistência à insulina, a qual se caracteriza pela diminuição na captação periférica de glicose e na síntese de glicogênio (BODEN, 2003). Há estudos reportando que uma dieta rica em gorduras saturadas, exclusivamente durante o período de amamentação, conduz à elevação da pressão sanguínea, função endotelial comprometida e homeostase anormal da glicose na prole adulta (KHAN *et al*, 2004).

Pesquisadores têm demonstrado que o metabolismo de dietas hiperlipídicas está relacionado com a ineficiência da sinalização da insulina (BODEN & CARNELL, 2003) e disfunção mitocondrial (PATTI, 2004) presentes no desenvolvimento da resistência à insulina e diabetes. Também tem sido demonstrado que dietas com alto teor de gordura aumentam a

quantidade de substrato disponível para a oxidação e o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória mitocondrial, aumentando a produção de radicais livres (RL) (YANG *et al*, 2006). Unger (2003) demonstrou que o aumento da ingestão de lipídeos aumenta a disponibilidade de ácidos graxos para os tecidos. Em indivíduos que são sensíveis a leptina (hormônio responsável pela lipólise e oxidação lipídica) esse excesso de ácidos graxos causa um aumento no PPAR-alfa, que por sua vez vai estimular a síntese de CPTI e acil CoA oxidase. Por outro lado, isto não acontece em ratos que não são sensíveis a leptina e há um aumento da lipogênese, da lipoperoxidação e da síntese de ceramidas.

1.1.4. RESISTÊNCIA À INSULINA

A resistência à insulina (RI) é um estado patológico definido como a incapacidade do organismo em responder normalmente às ações da insulina. A resistência hepática à insulina, por exemplo, está associada com o prejuízo à supressão da produção hepática de glicose pela insulina, resultando em hiperglicemia (ABDUL-GHANI, 2008). Indivíduos insulino-resistentes sofrem comprometimento na ação da insulina em múltiplos tecidos, incluindo músculo esquelético, e adipócito (GROOP LC, 1989; ABDUL-GHANI, 2008).

A resistência à insulina é um preditor da doença metabólica, um marcador independente de um estado onde a oferta excede a demanda de nutrientes. Ainda, o músculo está, aparentemente, se adaptando para oxidar lipídios, poupando glicose, o que favorece a hiperglicemia. Essa seletiva resistência à insulina agrava e acelera o surgimento da doença metabólica, levando a um aumento da síntese de triglicerídeos e ao aumento da liberação de AGL ligados a lipoproteínas (CHAVEZ JA, SCOTT A. SUMMERS, 2009).

No cérebro, a resistência à insulina leva à perda neuronal e prejuízo na função do neurotransmissor necessário para a plasticidade, a aprendizagem e a memória. Além disso, a resistência à insulina cerebral prejudica a sobrevivência e função de oligodendrócitos, resultando em diminuição da integridade da mielina e maior geração de ceramidas, que aumentam ainda mais a resistência à insulina cerebral, neuro-inflamação, estresse oxidativo e neurodegeneração (DE LA MONTE, S et al, 2009).

1.1.5. DIABETES MELLITUS TIPO II (DMII)

É amplamente aceito que há uma relação entre restrição inicial do crescimento e conseqüente desenvolvimento do diabetes tipo II (HALES & BARKER, 2001). A restrição do crescimento inicial da prole está sujeita a perda de tolerância a glicose idade-dependente e franco desenvolvimento de diabetes na idade adulta (PETRY et al, 2001). O mecanismo molecular subjacente a esta diminuição na tolerância à glicose ainda não está bem claro. No entanto, a hiperinsulinemia sugere que a intolerância à glicose está relacionada ao desenvolvimento da RI (OZANNE et al, 2003). Em um estudo com modelo de desnutrição protéica no período gestacional, foi verificado que a apoptose de células- β estava aumentada no pâncreas dos neonatos aos 14 dias de vida (PETRIK J, 1999). Os adipócitos de ratos (aos três meses de idade) que foram submetidos à desnutrição na vida fetal apresentaram uma taxa elevada de consumo basal de glicose estimulado por insulina. Em paralelo, foi observado neste mesmo estudo, aumento na atividade da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), que participa diretamente dos efeitos metabólicos da insulina. Apesar do aumento da atividade do PI3K, os adipócitos de filhotes submetidos à desnutrição foram resistentes à ação anti-lipolítica da insulina (OZANNE SE, 2003).

A regulação entre lipólise e lipogênese é efetuada através da interação de um número de fatores metabólicos e hormonais, cujos níveis são determinados pelo estado nutricional (KERSTEN S et al, 2001). Função adipocitária alterada tem sido demonstrada na prole de mães submetidas à desnutrição protéica, com aumento basal da captação de glicose estimulada pela insulina na prole jovem, associada com uma redução no tamanho do adipócito e aumentada expressão do receptor da insulina (OZANNE et al,1997; SHERPHERD et al, 1997). No entanto, com a idade, estes animais mostraram uma redução na captação da glicose e um prejuízo na sensibilidade a esta (FERNADEZ-TWINN et al, 2005). Esses dados demonstram a interação entre a lipotoxicidade e DMII.

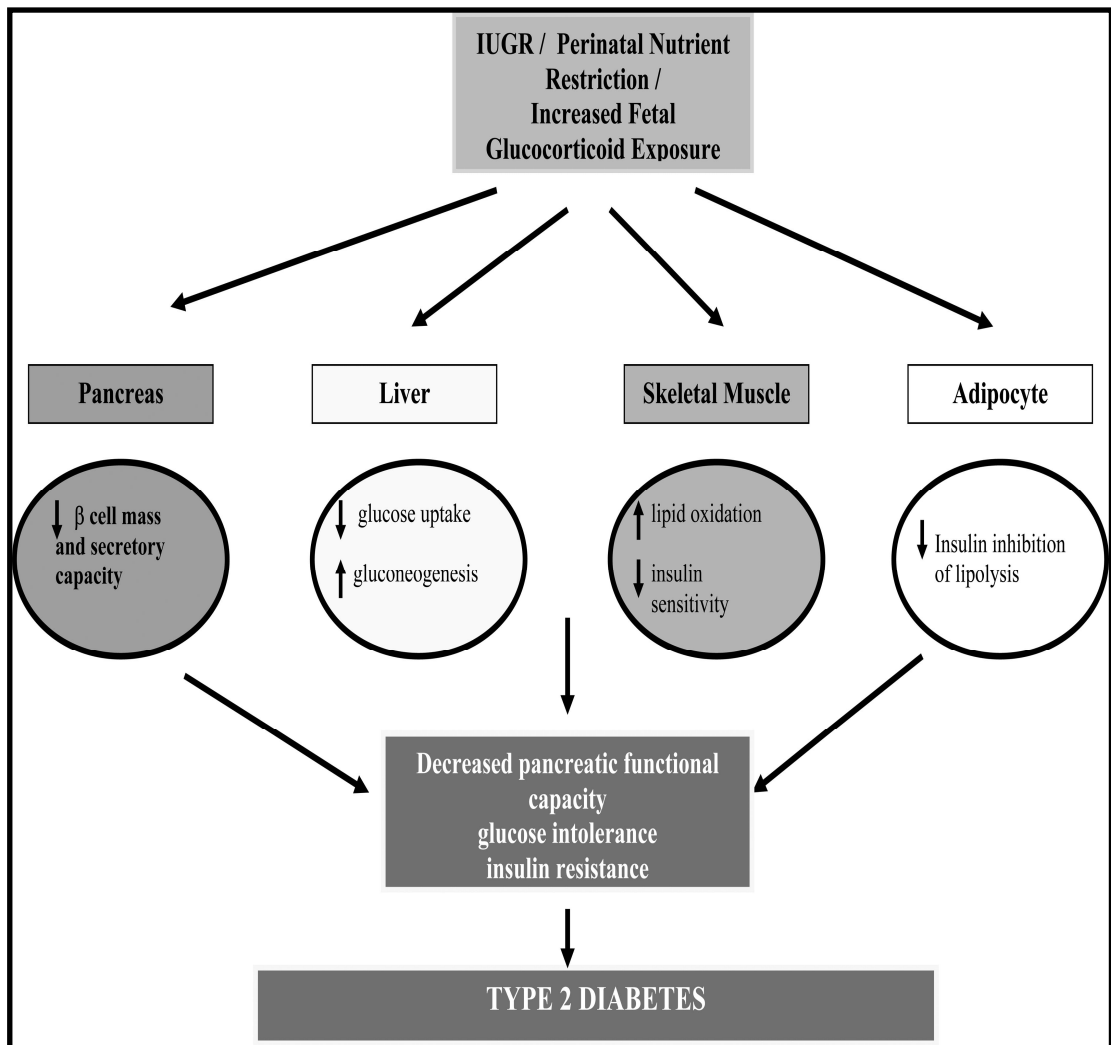


Figura 1: Diferentes vias subjacentes à programação perinatal e DMII (MCMILLEN, C, 2005)

1.1.6 GLICOTOXICIDADE, LIPOTOXICIDADE, ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO.

O mecanismo da etiopatogenia do DMII ainda não está totalmente esclarecido, no entanto, duas hipóteses são sugeridas para explicá-lo: a glicotoxicidade e a lipotoxicidade.

A glicotoxicidade consiste em danos estruturais e funcionais causados pela hiperglicemia crônica nas células β -pancreáticas e em tecidos-alvo da insulina. Alguns tipos celulares, como células endoteliais e mesangiais, não conseguem manter sua concentração intracelular de glicose normal diante da hiperglicemia (estas células não diminuiriam seus transportadores de glicose GLUT1 e GLUT1/GLUT2, respectivamente), tendo como decorrência uma elevada concentração dessa molécula intracelularmente. Esta elevada concentração de glicose intracelular ocasiona um aumento na produção e na oxidação do acetil-CoA no ciclo de Krebs, levando a um aumento da velocidade do transporte de prótons, com conseqüente aumento da diferença do potencial eletroquímico entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial. Quando esta diferença atinge um ponto crítico, ocorre um fluxo reverso de elétrons para a coenzima Q e desta para o O_2 gerando superóxido. A enzima superóxido dismutase (SOD) transforma o superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Ao mesmo tempo, o $O_2^{\cdot -}$ e a H_2O_2 , podem também, através de reações de Haber-Weiss e Fenton, respectivamente, formar radical hidroxil ($\cdot OH$). Esse aumento do radical hidroxil acarreta quebra do DNA com conseqüente ativação da enzima poli-(ADP)-ribose polimerase (PARP). A PARP inibe a enzima gliceraldeído-3-P-desidrogenase que, por sua vez, acarreta um grande aumento da via do polioliol, da hexosamina, ativação da PKC e a formação de AGEs (Produtos Finais de Glicação Avançada).

Mais recentemente, a lipotoxicidade como etiopatogenia do DMII tem sido bastante discutida. O adipócito, além do seu papel no armazenamento de ácidos graxos, tem uma importante função endócrina. Produz uma variedade de adipocitocinas (adiponectina, resistina, angiotensinogênio, fator de necrose tumoral- α , leptina, entre outras) envolvidas em funções diversas que incluem homeostase da glicose, inflamação, balanço energético, metabolismo lipídico, entre outros.

Segundo, DESPRÉS e LEMIEUX (2006), a obesidade é um estado pró-inflamatório, onde o tecido adiposo hipertrofiado é resistente à insulina e apresenta um acentuado aumento na liberação de ácidos graxos. Isso significa que tecidos extra-adiposos (fígado, pâncreas, músculo esquelético, etc) são expostos a um fluxo excessivo de lipídios e podem acumulá-los, desencadeando a formação de metabólitos tóxicos para as células (diacilglicerol, ceramidas, etc), os quais podem alterar cascatas de sinalização e gerar uma série de processos danosos intracelularmente (UNGER RH, 1995; MCGARRY, 2002, PRENTKI M, 2006; SAVAGE ET AL, 2007). O aumento de acil-CoA de cadeia longa aumenta a síntese de ceramida, a qual propicia a ativação de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), aumentando dessa forma a produção de peroxinitrito, potente molécula oxidante que pode induzir efeitos deletérios, tais como: quebra do DNA, comprometimento da dinâmica endotelial, produção de moléculas de adesão e oxidação dos antioxidantes, peroxidação lipídica, nitratação de aminoácidos aromáticos como a tirosina das proteínas, formando os resíduos 3-nitrotirosina (WAJCHENBERG et al., 2007). O estado de hiperglicemia gera um aumento de diglicerídio intracelular, este ativa a PKC δ que fosforila o receptor de insulina substrato 1 (IRS1) em serina, o que reduz a capacidade do IRS-1 de se ligar e ativar a PI-3K resultando em transmissão reduzida da sinalização da insulina (UNGER e ORCI, 2001; McGARRY, 2002). Além disso, a PKC pode fosforilar diretamente o inibidor do NF- κ B, I κ B (GOSH E

BALTIMORE, 1990), e esta fosforilação resultar na liberação de NF- κ B que é translocado do citosol para o núcleo, onde induz a transcrição de genes pró-inflamatórios como o TNF- α e a interleucina 6 (IL-6) (BARNES E KARIN, 1997).

Como mostrado acima, a glicotoxicidade e a lipotoxicidade contribuem para a progressiva deterioração da homeostase da glicose e dos lipídios, característica da DMII. Ambas parecem atuar por vias específicas e também por algumas vias em comum. As vias ativadas pela glicotoxicidade a partir do estresse oxidativo parecem poder ser ativadas também pelo excesso de espécies reativas de oxigênio geradas a partir da oxidação de ácidos graxos em alguns tipos celulares (BROWNLEE, 2004).

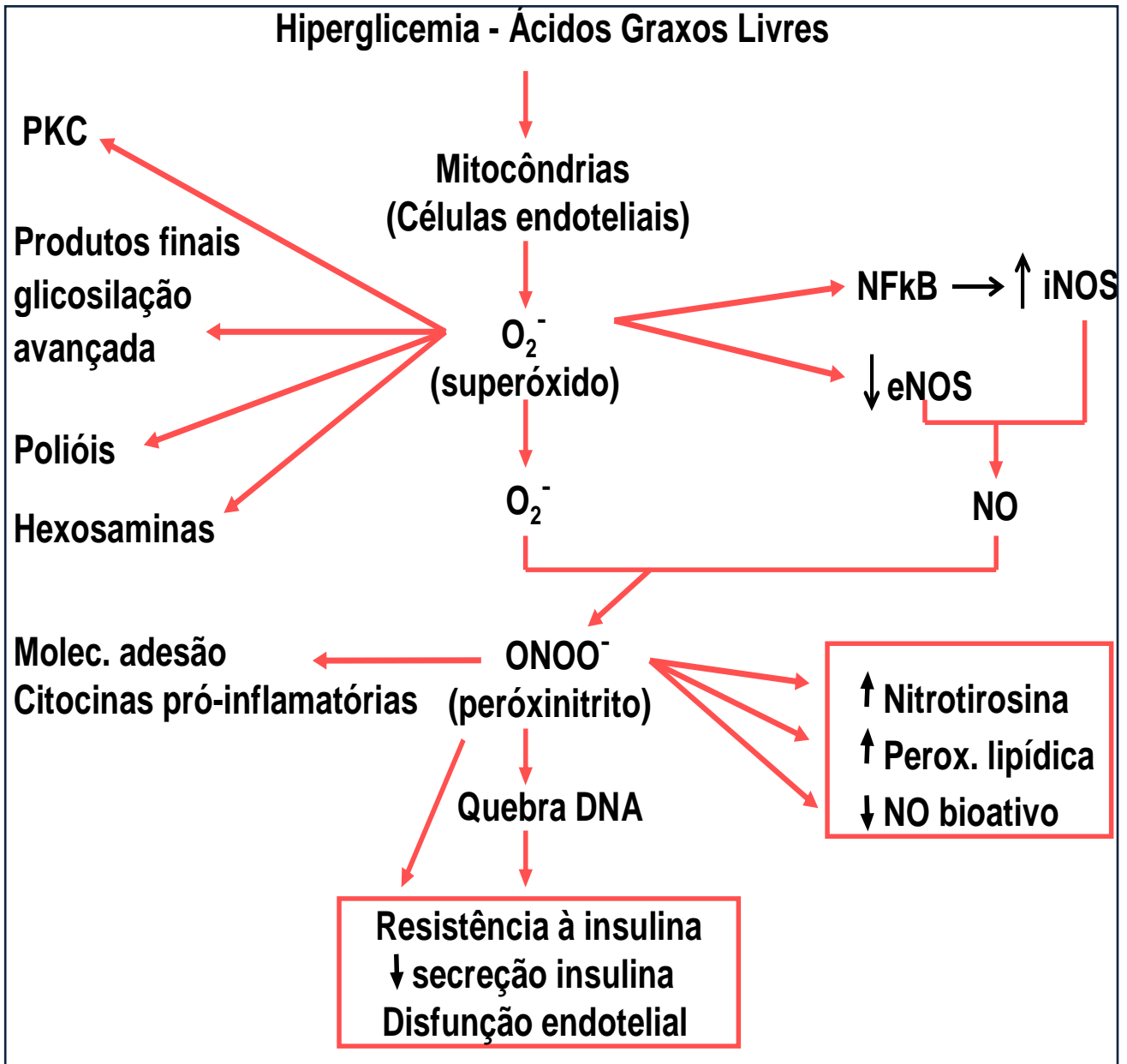


Figura 2: Quadro ilustrativo resumindo possíveis vias entre glicotoxicidade, lipotoxicidade, estresse oxidativo e inflamação

1.1.7 GLICONEOGÊNESE

Em 1963, Randle e colaboradores descreveram o ciclo ácido graxo-glicose, também conhecido como ciclo de Randle. Foi mostrado que o aumento do fluxo de ácidos graxos, em músculos cardíaco e diafragmático de ratos, elevava a produção de acetil-coenzima A e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) mitocondrial pela β - oxidação, levando a inibição do complexo piruvato desidrogenase, resultando no aumento da concentração de citrato. Assim, a alta concentração de citrato e ATP passam inibir a atividade da fosfofrutoquinase, levando a uma redução na via glicolítica. Conseqüentemente, o conteúdo de glicose-6-fosfato eleva-se inibindo a hexoquinase, causando acúmulo de glicose intracelular, comprometendo a captação desta (RANDLE et al., 1963; RANDLE et al., 1994; SHULMAN, 2000). Dessa forma, o aumento crônico dos níveis de ácidos graxos no plasma estimula a gliconeogênese (WILLIAMSON JR et al, 1966; FERRANNINI E. et al, 1983; DE FRONZO, 2009), induz resistência à insulina e prejuízo a secreção insulínica (KASHYAP et al, 2003, Carpentier A, 2000).

Os mecanismos envolvidos na programação incluem a interação entre o ambiente (fenótipo) e a expressão de genes (genótipo), que tem sido chamada de epigenética. (BURDGE et al, 2007) A fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCK) é considerada a enzima chave da gliconeogênese - catalisa a conversão de oxaloacetato + GTP em fosfoenolpiruvato + GDP + CO₂. O gene para a forma citosólica (PEPCKc) é agudamente regulado por uma variedade de sinais hormonais e dietéticos, os quais resultam na alteração desta enzima (HANSON,R & RESHEF,L.,1997). A identificação da regulação epigenética de expressão de genes com potencial mecanismo da indução de diferentes fenótipos pela nutrição materna,

durante o período crítico do desenvolvimento, suscita o questionamento sobre a atuação de outros estímulos ambientais.

1.1.8 DIETA HIPERLIPÍDICA, EROS/ERN, DMII E TECIDO NERVOSO

Tem sido descrito que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como radicais livres, podem participar ativamente de processos degenerativos simultaneamente ao DMII. Dano oxidativo em diferentes biomoléculas, bem como alteração na atividade de enzimas antioxidantes podem fazer parte deste cenário pró-oxidante (VALKO M, 2006).

Obrosova IG, et al (2009) demonstrou que alimentação com dieta hiperlipídica provoca estresse oxidativo e nitrosativo. Estresse oxidativo/nitrosativo é um mecanismo bem reconhecido na neuropatia diabética e, evidências para a importância dos radicais livres e oxidantes em déficits de condução nervosa, disfunção neurovascular, alterações metabólicas e comprometida transdução de sinal, bem como prejuízo neurotrófico tem sido suportado por uma série de grupos de pesquisa (HOUNSOM L et al, 2001; OBROSOVA IG et al, 2005; HO EC et al, 2006).

De La Monte et al (2006) e Moroz N et al (2008) mostraram recentemente que a exposição crônica à dieta hiperlipídica e a nitrosaminas leva ao aparecimento de DMII e NASH, além de evidências histopatológicas e bioquímicas da neurodegeneração e déficits na aprendizagem e na memória.

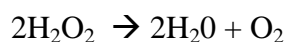
1.1.9 DEFESAS ANTIOXIDANTES

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo causado por ERO e ERN (espécies reativas de nitrogênio) provenientes do meio ambiente ou geradas pelo próprio organismo. Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Dentre as principais ERO estão a hidroxila (HO•), o superóxido (O₂•-), e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO•), óxido nitroso (N₂O₃), ácido nitroso (HNO₂), nitritos (NO₂-), nitratos (NO₃-) e peroxinitritos (ONOO) (HALLIWELL,1999).

As proteções conhecidas do organismo contra as ERO e ERN abrangem a proteção enzimática ou por micromoléculas, que podem ter origem no próprio organismo ou são adquiridas através da dieta. São conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes: o primeiro é composto por dois tipos de enzimas SOD, as quais catalisam a destruição do radical ânion superóxido O₂•- convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A ação desta enzima permite a eliminação do O₂•- mesmo em baixas concentrações, através da reação:

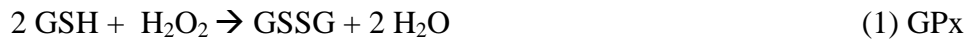


O segundo sistema de prevenção é formado pela enzima catalase que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em oxigênio e água, conforme a reação descrita abaixo:



O terceiro sistema é composto pela GSH em conjunto com duas enzimas GPx (glutathiona peroxidase) e GR (glutathiona redutase). Esse sistema também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutathiona opera em

ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida. A GSH reduz o H_2O_2 a H_2O em presença de GPx, formando uma ponte dissulfeto e, em seguida, a GSH é regenerada. (BABIOR BM, 1997).



Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina “E”), β -caroteno (provitamina “A”), ácido ascórbico (vitamina “C”), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (HALLIWELL, 1995).

Em nosso estudo, discutiremos a ação dos antioxidantes biológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Dessa forma, baseados no fato de que o tipo de dieta pode afetar profundamente o bem-estar do feto, bem como seu desenvolvimento pós-natal, objetivamos investigar os efeitos de uma dieta hiperlipídica (50% de lipídios), sobre a prole pós-desmame, de ratas submetidas a diferentes estados nutricionais em distintas fases iniciais do desenvolvimento – gestação e/ou lactação - sob parâmetros de resistência a insulina (RI) e espécies reativas de oxigênio (ERO).

2.2. Específicos

φ O protocolo utilizado, durante o período de tratamento de 4 meses, foi efetivo em aumentar o estresse oxidativo e a resistência à insulina dos animais submetidos a ambas as intervenções (desnutrição somada à dieta hiperlipídica), em relação à dieta controle?

φ A restrição protéica durante alguma das janelas críticas do desenvolvimento (gestação e/ou lactação) ampliaria o dano causado pela dieta hiperlipídica?

φ O sistema nervoso (SN) estará protegido dos efeitos deletérios desta “programação metabólica”?

PARTE II

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho Experimental

Dezoito ratas Wistar virgen (60 dias de vida) e 6 ratos machos Wistar (75 dias de vida) foram mantidos em número de 3 fêmeas para 1 macho, em cada caixa, com livre acesso à água e ração padrão. Após a confirmação do acasalamento, as ratas foram colocadas individualmente em diferentes caixas. No primeiro momento, as mães foram designadas a 2 grupos nutricionais: o grupo 1 recebeu ração controle (25% proteína), e o grupo 2, recebeu dieta com 7% de proteína, ambos, durante toda a gestação. Utilizamos um modelo de desnutrição contendo 7% de proteína para o grupo experimental, com dieta isocalórica ao grupo controle (com 25% de proteína) a fim de estudar os diferentes parâmetros bioquímicos (Schweigert et al, 2005). Grupos Experimentais: DG-desnutrido na gestação, DL-desnutrido na lactação, N/H-normonutrido durante a gestação e a lactação e C-controle, foram tratados durante 4 meses.

Após o nascimento, os filhotes machos das mães desnutridas foram amamentados por mães que foram alimentadas com dieta controle durante a gestação (formando o grupo DG). O restante dos filhotes machos foram divididos em 3 grupos: C (Controle: 25% de proteína, 10% de lipídios e 65% carboidrato); NH (normonutrido - dieta controle durante gestação e lactação) DL (desnutrido na lactação: a rata mãe recebeu dieta com 7% de proteína durante a lactação). Após o nascimento (1 dia pos-natal) estes grupos foram ajustados em número de 8 filhotes para cada rata, exceto o grupo desnutrido na gestação (DG), o qual foi colocado em número de 4 filhotes para cada rata mãe. Aos 21 dias de idade, a prole foi desmamada. Aos 30

dias de vida, todos passaram a receber dieta hiperlipídica (50% de lipídios), exceto o controle. Os animais foram provenientes do biotério do ICBS - Departamento de Bioquímica-UFRGS. Eles foram mantidos em um ciclo de luminosidade claro-escuro de 12h (luz: 07-19h) a temperatura de 22 +/- 2 °C. As dietas foram oferecidas ad libitum a todos os animais, assim como a água.

A ninhada quando desmamada (21 dias pós-natal), passou a receber dieta controle até o 30° dia de vida. Durante os 90 dias subsequentes, os grupos receberam dieta conforme resumido abaixo:

C (Controle: 25% de proteína, 10% de lipídios e 65% de carboidratos);

NH, DG, DL (Hiperlipídica: 25% de proteína, 25% de carboidrato e 50% de lipídios).

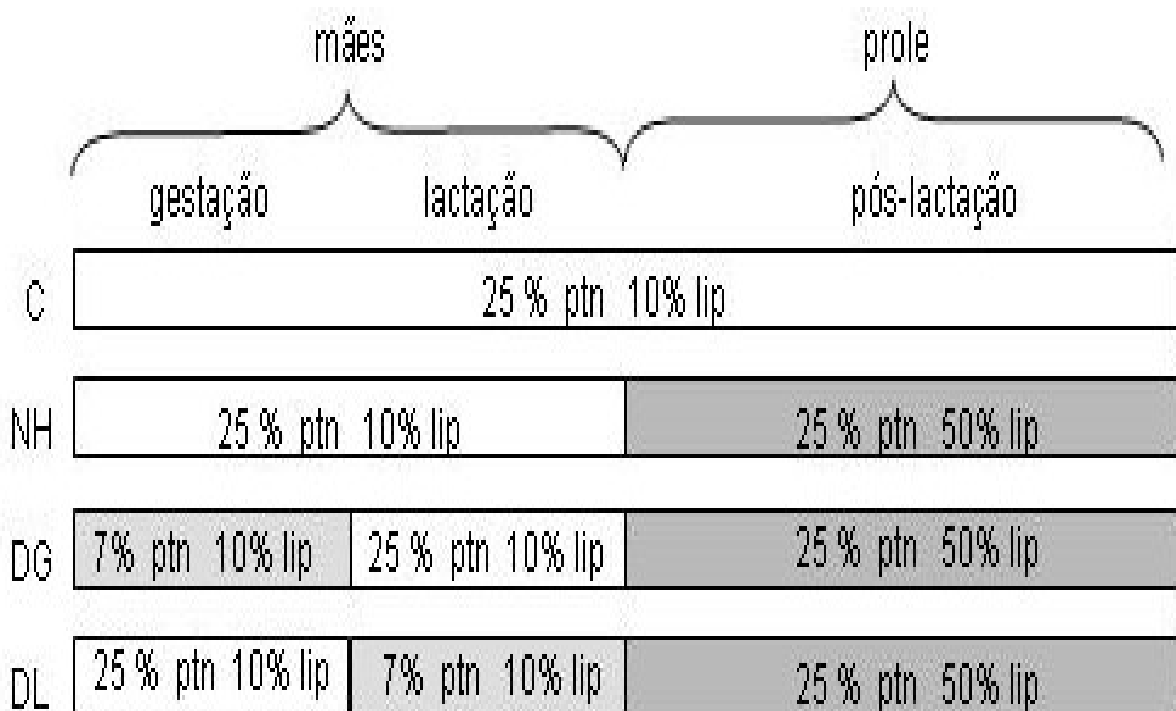


Figura 2. Esquema das dietas de acordo com o grupo experimental.

3.2 Curva de crescimento:

Os animais foram pesados semanalmente durante as 14 semanas de tratamento;

3.3 Teste de tolerância à glicose (TTG)

O teste de tolerância à glicose foi realizado na semana anterior ao sacrifício dos animais. Uma solução de glicose a 50% foi injetada intraperitonealmente (2mg/g) após seis horas de jejum. O sangue foi coletado a partir de uma pequena perfuração na cauda dos animais imediatamente antes e 30, 60 e 120 minutos após a injeção. A verificação da glicemia nos diferentes tempos foi efetuada por meio de um glicosímetro (Accucheck Active, Roche Diagnostics®, EUA).

3.4 Insulina plasmática

Foi determinada por radioimunoensaio (RIA);

3.5 Síntese de glicogênio hepático a partir de alanina (Glicogênese indireta)

Pedaços de fígado de 80 mg a 100 mg foram cortados a fatias de 300 µm em fatiador de tecidos (McIlwain tissue chopper) e incubados com 0,2 mM de L-alanina + 0,3µCi de [U-¹⁴C]alanina por 1,0 h a 37°C de acordo com o método Dolnikoff (DOLNIKOFF et al. 2001).

3.6 Determinação da concentração de glicogênio hepático

Através de reação colorimétrica, segundo método de KRISMAN (1962), medida em espectrofotômetro.

3.7 Determinação de concentração de triglicerídeos hepáticos.

Concentração de triglicerídeo hepático e plasmático através do método Enzimático-Trinder;

3.8 Determinação do colesterol plasmático

Medido usando kit comercial (Labtest, MG, Brasil). As reações foram realizadas utilizando o aparato da Labmax (Labtest, MG, Brasil).

3.9 Determinação da quantidade de ácidos graxos livres

Os ácidos graxos circulantes no plasma foram medidos utilizando-se o Kit comercial (Roche);

3.10 Determinação da atividade da PEPCK

A atividade da PEPCK foi verificada em fígado de animais submetidos a dietas hiperlipídicas, em conjunto com o Laboratório de Fisiologia Comparada, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS. A determinação da atividade da PEPCK foi realizada por meio da homogeneização de 500mg de tecido hepático obtido de cada animal em sacarose 0,25M e PMSF 1 mM. Todos os passos foram realizados mantendo-se temperatura entre 0 e 3°C. Este homogeneizado foi centrifugado a 600 x g. A fase abaixo da camada lipídica foi separada e o restante foi descartado. A atividade da PEPCK foi determinada por meio de um método baseado na reação de troca $[H^{14}CO_3^-]$ -oxaloacetato. A PEPCK catalisa a descarboxilação nucleotídeo-dependente do ácido oxaloacético para produzir fosfoenolpiruvato. Inosina trifosfato (ITP) foi o nucleotídeo utilizado. Alíquotas do homogeneizado foram acrescentadas em solução-tampão e incubadas por 4 minutos, a 37°C,

sob agitação (60 ciclos/min). Para cada amostra de tecido obtida (uma para cada animal), foram incubadas três alíquotas em tampão contendo ITP e duas alíquotas sem ITP (branco). A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético 5%. Após centrifugação, a solução foi gaseificada por 10 minutos com CO₂ para remoção de ¹⁴CO₂ residual não incorporado ao fosfoenolpiruvato e alíquotas foram imediatamente transferidas para vials contendo Tolueno-Triton X-100 (2:1 v/v) – PPO – POPOP e lidas em contador de cintilação líquida. A média da leitura dos brancos de cada amostra em que o uso de ITP foi omitido foi descontada dos valores das incubações desta mesma amostra contendo ITP (OLIVEIRA GT & DA SILVA RMS, 1997). Os valores da atividade da PEPCCK foram expressos como umoles de H¹⁴CO₃⁻ incorporados *per* mg de proteína *per* minuto Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. O conteúdo de proteína foi dosado a partir do método de Lowry (1951).

3.11 Medida das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

(TBARS)

Como um índice para medida da lipoperoxidação lipídica, nós utilizamos o TBARS, durante uma reação como previamente descrito por (Draper HH & Hadley M., 1990). Resumidamente, os tecidos foram homogeneizados em 50mM de tampão fosfato utilizando Potter-Elvehjem para homogeneizar. Uma alíquota (200ml) foi misturada com ácido tricloroacético 15% (400ml) e centrifugado a 4000xg por 10min. Após, o sobrenadante foi misturado com igual volume de ácido tiobarbitúrico 0,67%. Este sistema foi aquecido em banho de água fervente por 15min e o TBARS foi determinado por absorbância a 535nm. O conteúdo de proteína foi medido pelo método de Lowry (1951) e os resultados foram expressos em nmol TBARS/MG de proteína.

3.12 Medida da Atividade das enzimas SOD e CAT

A fim de determinar a atividade da CAT, os tecidos foram sonicados em 50Mm de tampão fosfato e a suspensão resultante foi centrifugada a 3000xg por 10min. O sobrenadante foi utilizado para o teste enzimático. A atividade da CAT foi medida conforme descrito por Aebi (1984). Para determinar a atividade da SOD, os tecidos foram homogeneizados em 50mM de tampão glicina utilizando Potter-Elvehjem para homogeneizar. A atividade da SOD foi verificada pela medida da inibição da auto-oxidação da adrenalina em um sistema contendo 50mM de tampão glicina, 1Mm de adrenalina e a amostra. A atividade da SOD foi expressada em U/mg de proteína, como descrito por Bannister JV e Calabrese L (1987).

3.13 Determinação da produção intracelular de ROS (DCF)

A produção intracelular de ROS foi detectada utilizando o composto permeável celular não-fluorescente, 2-7 Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA). DCF-DA é hidrolisado pela esterases intracelulares e então oxidado por ROS para o composto fluorescente 2-7 diclorofluoresceína (DCFH). A fluorescência foi medida no aparelho (Spectra Max Gemini XPS, Molecular Devices, USA) com excitação a 485 nm e emissão a 520 nm (QUINCOZES-SANTOS A. et al, 2009). Os valores são obtidos como unidades de fluorescência/mg proteína e expressado como % do controle.

3.14 Quantificação da Glutathiona (GSH)

Os níveis de glutathiona (nmol/mg proteína) foram medidos como previamente descritos ((BROWNE RW, ARMSTRONG D, 1998). O homogenato dos tecidos foram diluídos em 10x de 100Mm de tampão fosfato de sódio, Ph 8.0, contendo 5Mm de EDTA, e a

proteína foi precipitada com 1.7% de ácido meta fosfórico. O sobrenadante foi medido com o o-phthaldialdeyde (1 mg/mL metanol) a temperatura por 15min. Fluorescência foi medida pela excitação e emissão de comprimentos de ondas de 350 e 420nm, respectivamente. A curva de calibração foi feita com solução padrão de GSH (0-500 IM).

3.15 Quantificação de Proteína

O conteúdo de proteína foi medido pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Análise Estatística

Comparações entre os diferentes grupos foram realizadas empregando análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste post hoc de Tukey, quando necessário. Os resultados foram expressos em média \pm DP. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico SPSS 15.0. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

4.1 Parâmetros Corporais

Os dados da tabela 1 mostram que não houve diferença significativa entre os pesos dos animais ao nascimento; os animais tratados com dietas hiperlipídicas após o período gestacional, quando desnutridos na gestação, mesmo não ganhando maior peso corporal, sofrem maior acúmulo de tecido adiposo retroperitoneal e epididimal. Já os animais desnutridos na lactação, conforme postulado na literatura, não conseguem recuperar o peso, mesmo recebendo uma dieta hiperlipídica após este período. Em relação ao tamanho do fígado dos animais, não houve diferença significativa, já os rins dos animais desnutridos na gestação e lactação mostraram-se diminuídos em relação aos grupos que não sofreram restrição protéica.

PARÂMETROS CORPORAIS	C	NH	DG	DL
Peso Corporal Inicial (g)	6,34 ± 0,51^a	6,0 ± 0,57^a	5,9 ± 0,12^a	6,37 ± 0,67^a
Peso Corporal Final (g)	396 ± 35,7 ^{ab}	417,5 ± 36,8 ^a	407,5 ± 32,9 ^{ab}	334,6 ± 19,2 ^b
Ganho de Peso Corporal (g)	389,45 ± 35 ^a	411,4 ± 42,2 ^a	401,6 ± 32,7 ^a	306,3 ± 18,5 ^b
T.A. Retroperitoneal (g)	6,36 ± 0,8 ^a	6,77 ± 1,36 ^a	8,77 ± 2,0 ^b	4,39 ± 0,73 ^c
T.A. Retroperitoneal (%)	1,6 ± 0,2 ^a	1,54 ± 0,3 ^a	2,15 ± 0,6^b	1,31 ± 0,3^c
T.A. Epididimal (g)	7,39 ± 0,51 ^a	6,82 ± 0,53 ^a	8,29 ± 0,70 ^a	4,11 ± 0,4 ^b
T.A. Epididimal (%)	1,86 ± 0,3 ^a	1,63 ± 0,2 ^a	2,03 ± 0,23^b	1,23 ± 0,2^c
Peso Fígado (g)	9,98 ± 1,2 ^a	10,68 ± 0,78 ^a	10,11 ± 0,42 ^a	8,14 ± 0,52 ^b
Peso Fígado (%)	2,52 ± 0,4 ^a	2,56 ± 0,34 ^a	2,48 ± 0,13 ^a	2,43 ± 0,4 ^a
Peso Rim (g)	2,32 ± 0,22 ^a	2,34 ± 0,11 ^a	2,01 ± 0,06 ^b	1,71 ± 0,15 ^c
Peso Rim (%)	0,58 ± 0,05 ^a	0,56 ± 0,04 ^a	0,49 ± 0,04 ^b	0,50 ± 0,09 ^b

Tabela 1. Contém alguns parâmetros corporais avaliados entre os diferentes grupos: C (controle), NH (normonutrido durante a gestação e a lactação), DG (desnutrido durante a gestação), DL (desnutrido na lactação). Foi verificado o peso corporal ao nascimento (inicial) e na semana em que completava o período de tratamento (final), bem como o ganho de peso ao longo deste intervalo (ganho de peso corporal). Além disso, ao final dos 4 meses de tratamento, os pesos dos tecidos adiposos (TA) retroperitoneal e epididimal também foram verificados, bem como, o dos tecidos hepático e renal destes animais. Os valores representam média ± D.P., n=8 animais/grupo, exceto DG, n=4. Diferentes letras sobrescritas, na mesma linha, apresentam diferença quando comparadas entre si (p<0,05), análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey.

4.2 Parâmetros Bioquímicos

Como pode ser observado, os níveis de glicose e de insulina plasmáticos dos ratos desnutridos no período gestacional (DG), tratados com dietas hiperlipídicas dos 30 aos 120 dias de tratamento, indicam que estes animais tornaram-se hiperglicêmicos e hiperinsulinêmicos. Comparando com o grupo NH, normonutrido nos períodos gestacional e lactacional, houve um aumento significativo da insulina nos DG e DL, bem como, dos 3 grupos (NH, DG e DL) em relação ao C. Observamos também que os grupos DG e DL apresentaram um aumento nos níveis de colesterol e triglicerídeos hepáticos e colesterol plasmático apenas em relação ao grupo controle.

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	C	NH	DG	DL
Glicose (mg/dL)	102 ± 5,2 ^a	117 ± 14,1 ^{c,d}	128,5 ± 7,5 ^d	106,3 ± 9,8 ^{a,c}
Insulina (μUI/ml)	14,05 ± 2,88 ^a	16,99 ± 1,57 ^b	21,05 ± 2,31 ^c	20,15 ± 1,42 ^c
Colesterol (mg/dL)	124,2 ± 12,33 ^a	178,86 ± 11,58 ^b	221,17 ± 18,76 ^c	270,09 ± 9,12 ^d
Colesterol (mg/100mg de fígado)	1,36 ± 0,06 ^a	1,95 ± 0,28 ^b	2,01 ± 0,26 ^b	2,02 ± 0,31 ^b
Triglicerídeos (mg/ dL)	138,22 ± 29,81 ^a	192,54 ± 18,17 ^b	180,52 ± 15,97 ^b	181,23 ± 14,03 ^b
Triglicerídeos (mg/100mg de fígado)	2,18 ± 0,22 ^a	4,68 ± 0,5 ^b	5,3 ± 0,8 ^b	5,1 ± 0,9 ^b
Ácidos Graxos Livres (mg/dL)	411,43 ± 17,31 ^a	502,17 ± 20,35 ^b	579,37 ± 37,18 ^{b,c}	633,22 ± 60,22 ^d

Tabela 2. Mostra alguns parâmetros bioquímicos após os 4 meses de tratamento nos grupos estudados. Plasmáticos: glicose, insulina, colesterol, triglicerídeos e ácidos graxos livres. Hepáticos: triglicerídeos e colesterol. Os valores representam média ± D.P., n=8 animais/grupo, exceto DG, n=4. Diferentes letras sobrescritas, na mesma linha, apresentam diferença quando comparadas entre si (p<0,05), análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey.

4.3. Teste de Tolerância à Glicose

Os animais alimentados com dieta hiperlipídica mostraram maior glicemia em relação ao controle, após a administração de glicose. No entanto, a dieta hiperlipídica somada a uma restrição protéica durante a gestação ou lactação, mostrou-se ainda mais significativa em relação ao C.

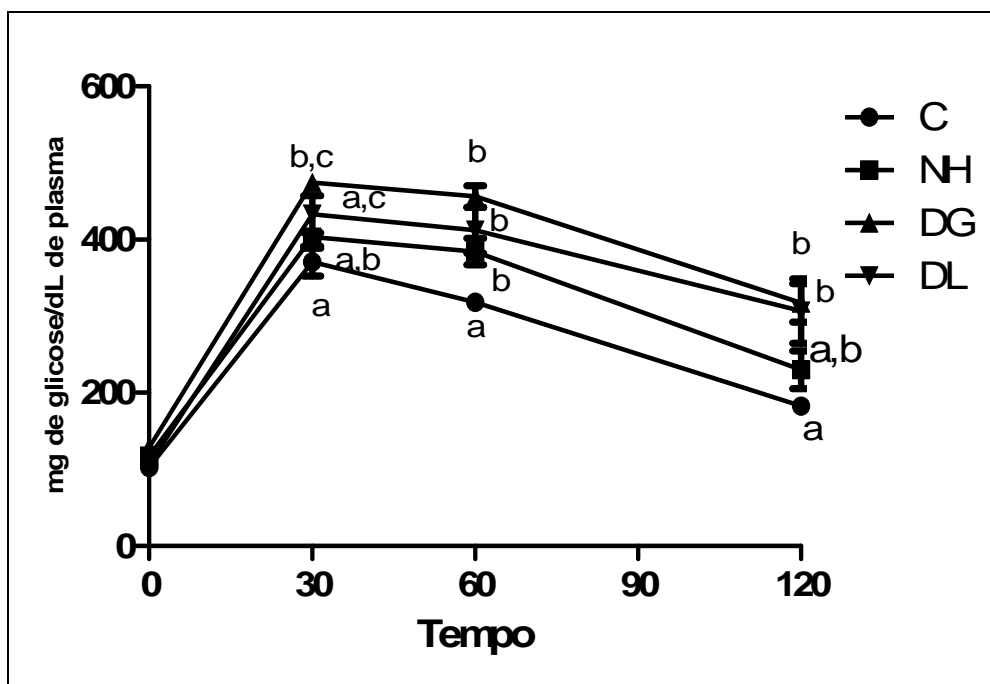


Fig.3: Teste de tolerância a glicose (TTG) após injeção i.p. de solução de glicose 50% (2,0 g/kg rato) aos 4 meses de tratamento. Os níveis de glicose são expressos em mg/dL. Os valores representam média \pm D.P., n=8 animais/grupo, exceto DG, n=4. T0: DG/C p=0,014; T30: DG/C p=0,005, DG/NH p= 0,088, DL/C p=0,091; T60: DG/C p=0,002; NH/C: p=0,042, DL/C p=0,025; T120: DG/C p= 0,016, DL/C p=0,025. Diferentes letras, no mesmo tempo avaliado, apresentam diferença quando comparadas entre si (p<0,05), análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey.

4.4. Atividade da PEPCK

A fim de mensurarmos a gliconeogênese no tecido hepático, avaliamos a atividade da enzima PEPCK, chave nesta via. Observamos, na figura 4, um aumento significativo da atividade a enzima PEPCK nos grupos NH, DG e DL.

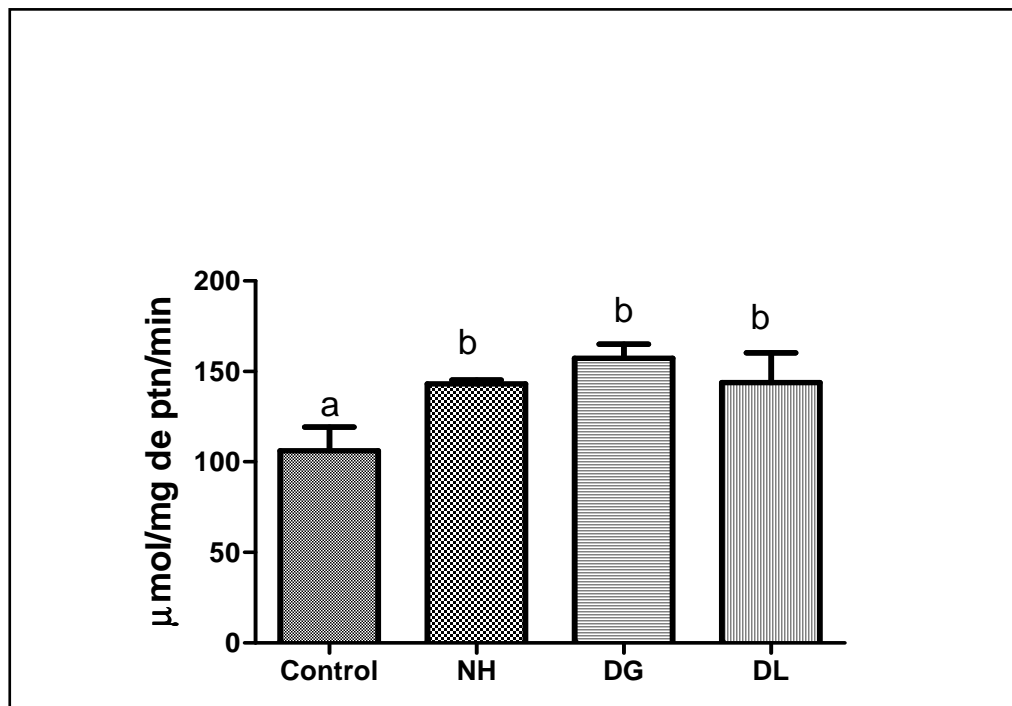


Fig.4: Atividade da PEPCK citosólica hepática na prole aos 4 meses de tratamento. Dados expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de ptn/min. Os valores representam media \pm D.P., $n=4$ animais/grupo. Diferentes letras apresentam diferença quando comparadas entre si ($p<0,05$), análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey.

4.5. Concentração de Glicogênio Hepático

Com o intuito de avaliar o efeito do tratamento sobre o conteúdo de glicogênio hepático, verificamos a concentração do glicogênio no fígado. Como mostrado na figura 5, ambos os grupos desnutridos, respectivamente na gestação (DG) e lactação (DL), apresentaram menor conteúdo de glicogênio hepático em relação aos grupos que não sofreram a mesma restrição protéica.

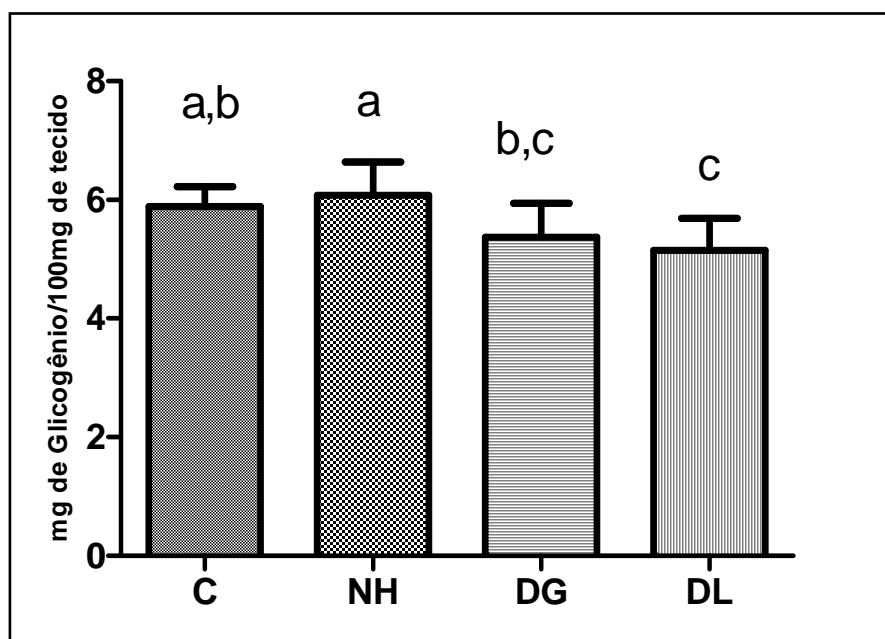


Fig.5: Concentração de glicogênio hepático. Expressa em mg de glicogênio/100 mg de tecido. Os valores representam média \pm D.P, n=8/grupo, exceto DG, n=4 animais/grupo. Diferentes letras apresentam diferença quando comparadas entre si ($p < 0,05$), análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey.

4.6. Síntese de Glicogênio Hepático a partir de alanina

A fim de avaliar a síntese de glicogênio, via indireta, utilizamos alanina como substrato. Como podemos observar na figura 6, os grupos que sofreram restrição protéica, mostraram diminuída síntese a partir de alanina.

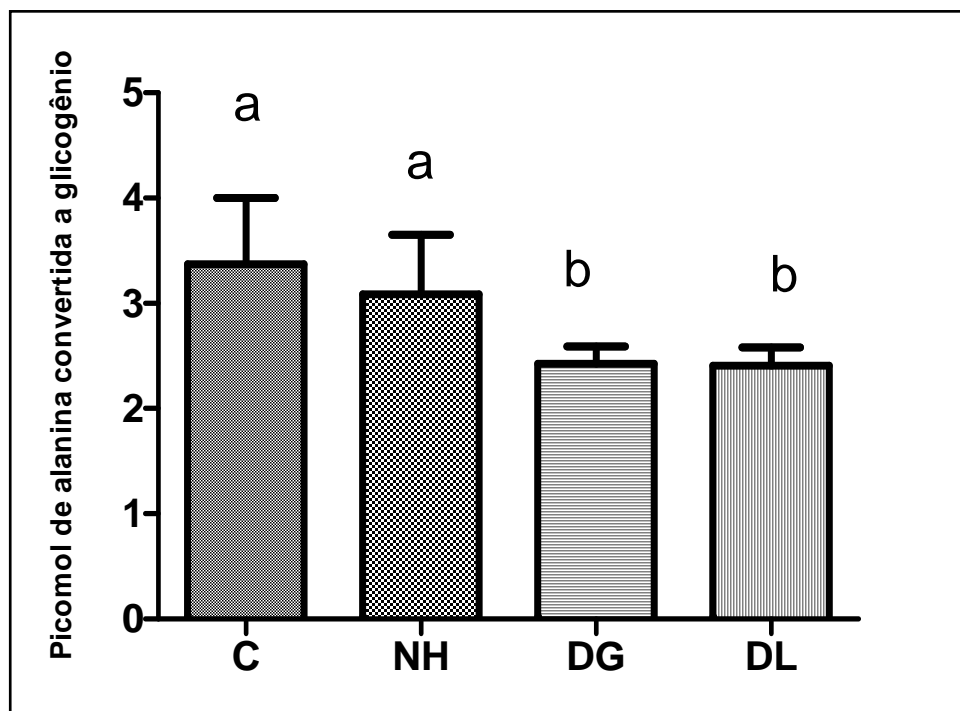


Figura 6: Síntese de glicogênio a partir de L[U-¹⁴C] alanina na prole aos 4 meses de idade. Os valores representam média ± D.P, n=8/grupo, exceto DG, n=4 animais/grupo. Diferentes letras apresentam diferença quando comparadas entre si (p<0,05), análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey.

4.7. Efeito do tratamento dietético nas enzimas SOD e CAT no córtex cerebral.

Como podemos verificar ocorre uma diminuição na SOD no grupo DG e DL. Já na catalase, há um aumento significativo em DG, bem como uma diminuição em DL.

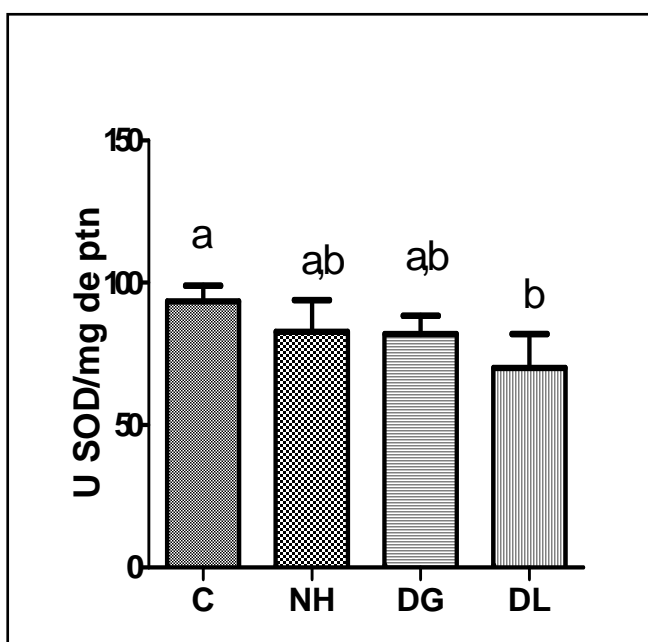


Fig 7

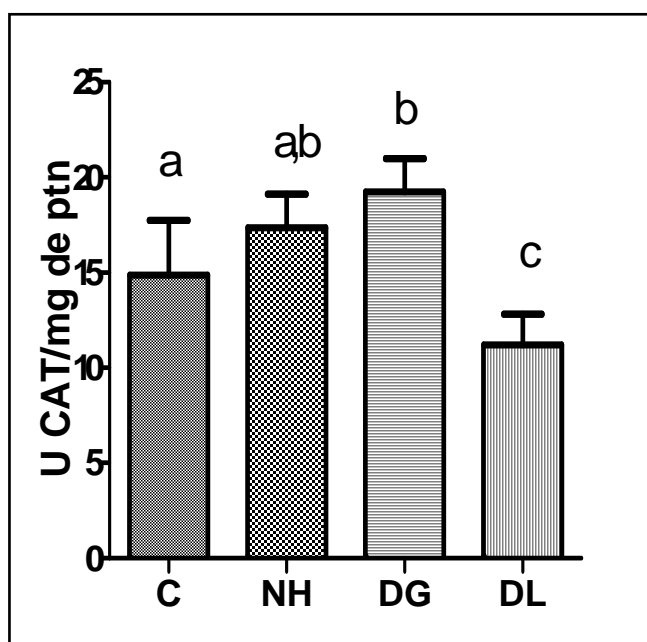


Fig.8

Fig.7, 8: Efeito dos diferentes tratamentos sobre as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os valores representam media \pm D.P, n=4 animais/grupo. Diferentes letras apresentam diferença quando comparadas entre si ($p < 0,05$), análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey. Teste realizado em duplicata.

4.8. Conteúdo de GSH em córtex cerebral

Através da figura 9, podemos verificar uma diminuição do conteúdo de GSH no córtex dos grupos 3 grupos que receberam dieta hiperlipídica (NH, DG e DL); os animais que sofreram restrição protéica, somada a posterior ingestão de dieta hiperlipídica (DG e DL), apresentaram conteúdo ainda menor de GSH em relação ao grupo controle.

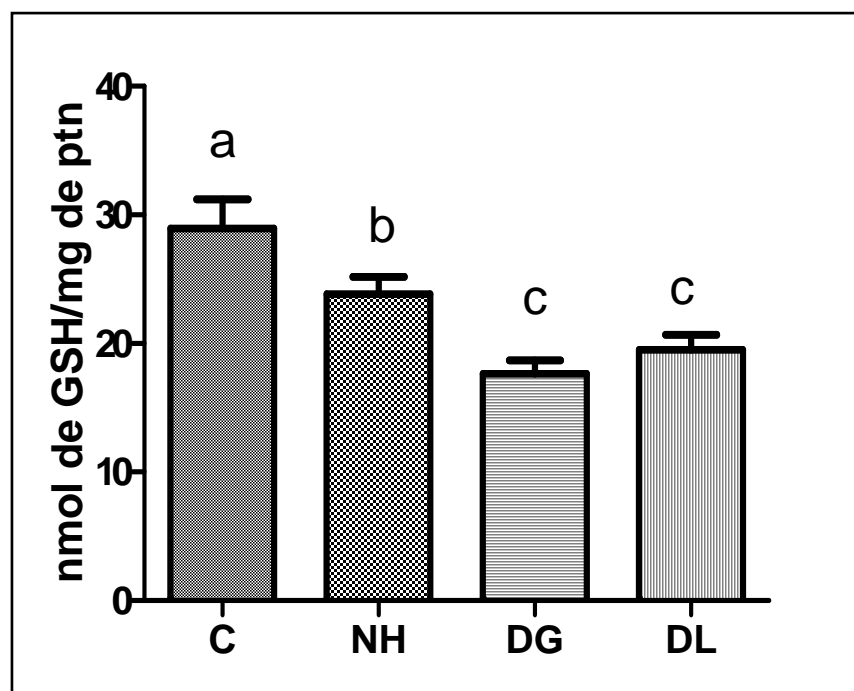


Fig.9: Os valores representam media \pm D.P, n=5 a 7 animais/grupo. Diferentes letras apresentam diferença quando comparadas entre si ($p < 0,05$), análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey. Teste realizado em triplicata.

4.9. Determinação da produção intracelular de ROS (DCF):

Como podemos verificar através da fig.10, a produção intracelular de ROS no córtex cerebral mostrou-se significativamente aumentada em DG e DL.

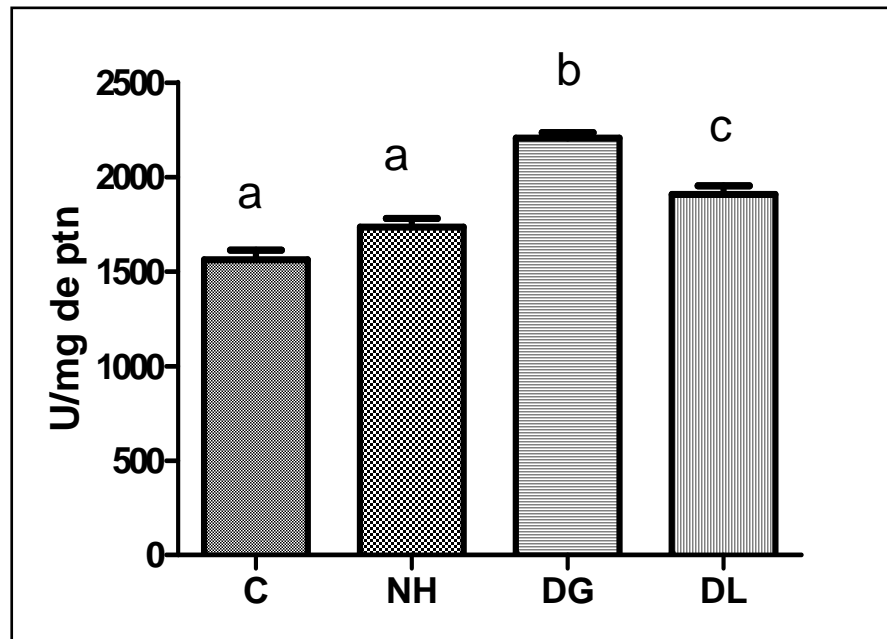


Fig.10: Mostra a produção intracelular de ROS através do método DCF. Os valores representam media \pm D.P, n= 7 animais/grupo. Diferentes letras apresentam diferença quando comparadas entre si ($p < 0,05$), análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey. Teste realizado em triplicata.

4.10. Medida das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS):

Como um índice para medida da lipoperoxidação lipídica, nós utilizamos o TBARS, como podemos ver, não há diferença significativa entre os grupos no córtex cerebral.

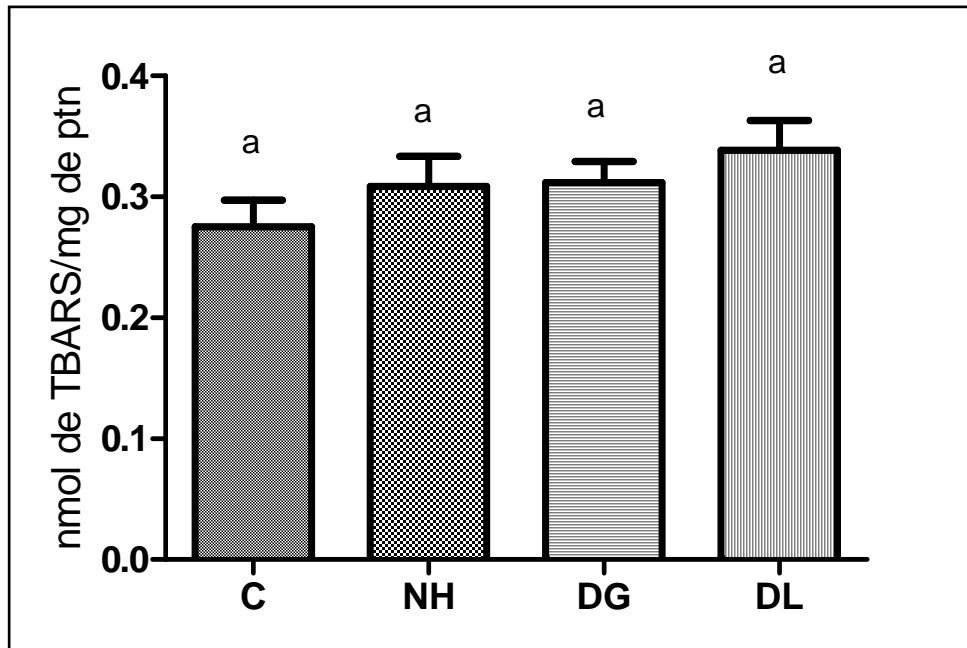


Fig.11: Mostra a medida da lipoperoxidação lipídica em córtex cerebral. Os valores representam media \pm D.P, n= 7 animais/grupo. Análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey. Teste realizado em duplicata.

4.11. Efeito do tratamento dietético nas enzimas SOD e CAT no tecido hepático.

Como podemos verificar ocorre uma diminuição na SOD no grupo DG e DL. Já na catalase, há um aumento significativo em DG e DL.

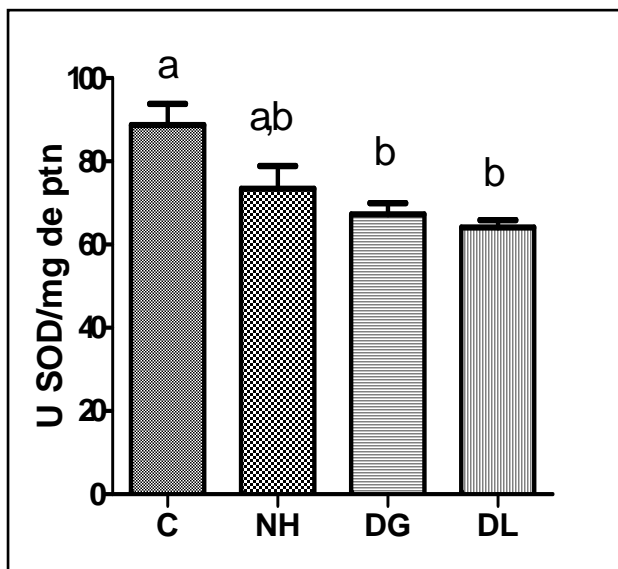


Fig. 12

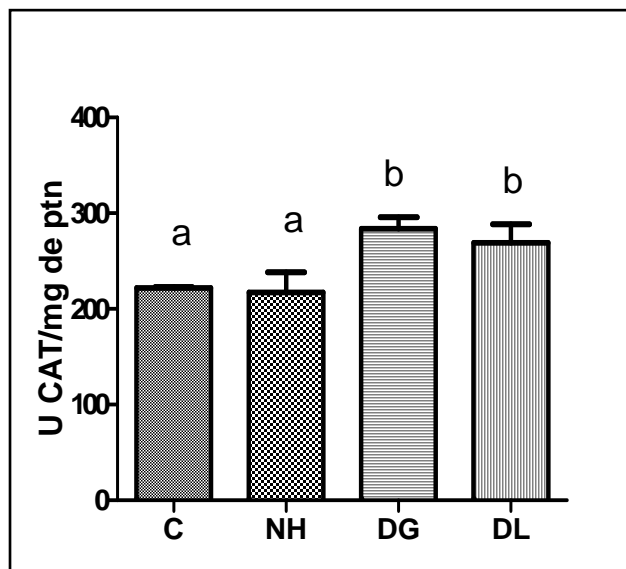


Fig. 13

Fig.12, 13: Efeito dos diferentes tratamentos sobre as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os valores representam media \pm D.P, n=4 animais/grupo. Diferentes letras apresentam diferença quando comparadas entre si ($p < 0,05$), análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey. Teste realizado em duplicata.

4.12. Conteúdo de GSH em Tecido Hepático:

Através da figura 14, podemos verificar uma diminuição do conteúdo de GSH no tecido hepático dos grupos 3 grupos que receberam dieta hiperlipídica (NH, DG e DL); os animais que sofreram restrição protéica, somada a posterior ingestão de dieta hiperlipídica (DG e DL), apresentaram conteúdo ainda menor de GSH em relação ao grupo controle.

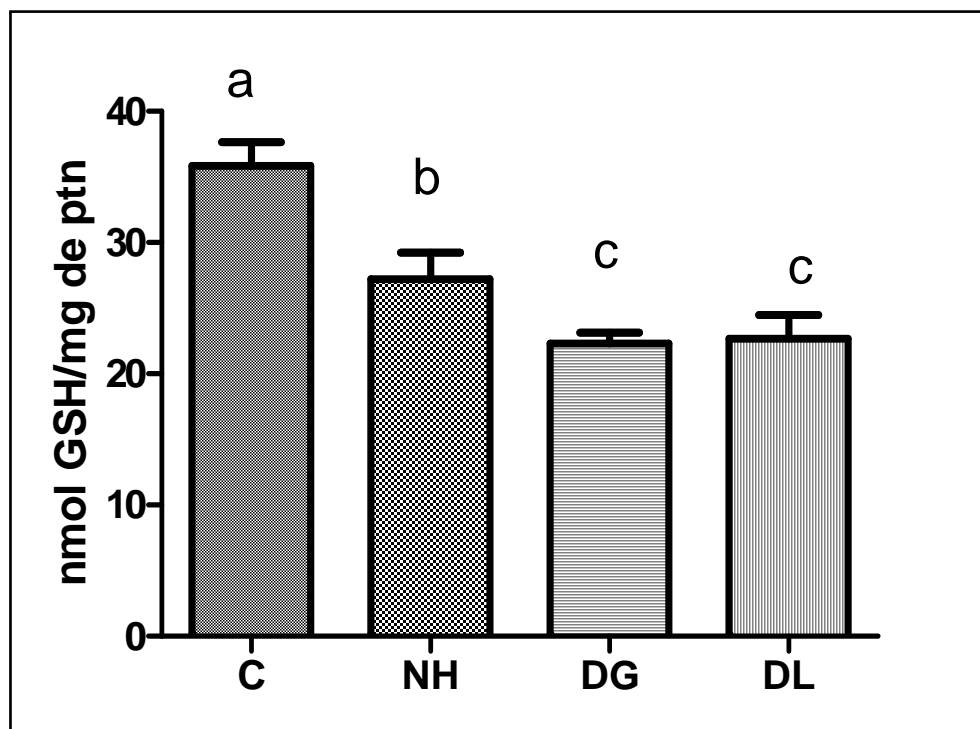


Fig.14: Os valores representam media \pm D.P, n=5 a 7 animais/grupo. Diferentes letras apresentam diferença quando comparadas entre si ($p < 0,05$), análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey. Teste realizado em triplicata.

4.13. **Determinação da produção intracelular de ROS (DCF):** como podemos verificar através da fig.15, a produção intracelular de ROS no tecido hepático mostrou-se significativamente aumentada em DG e DL.

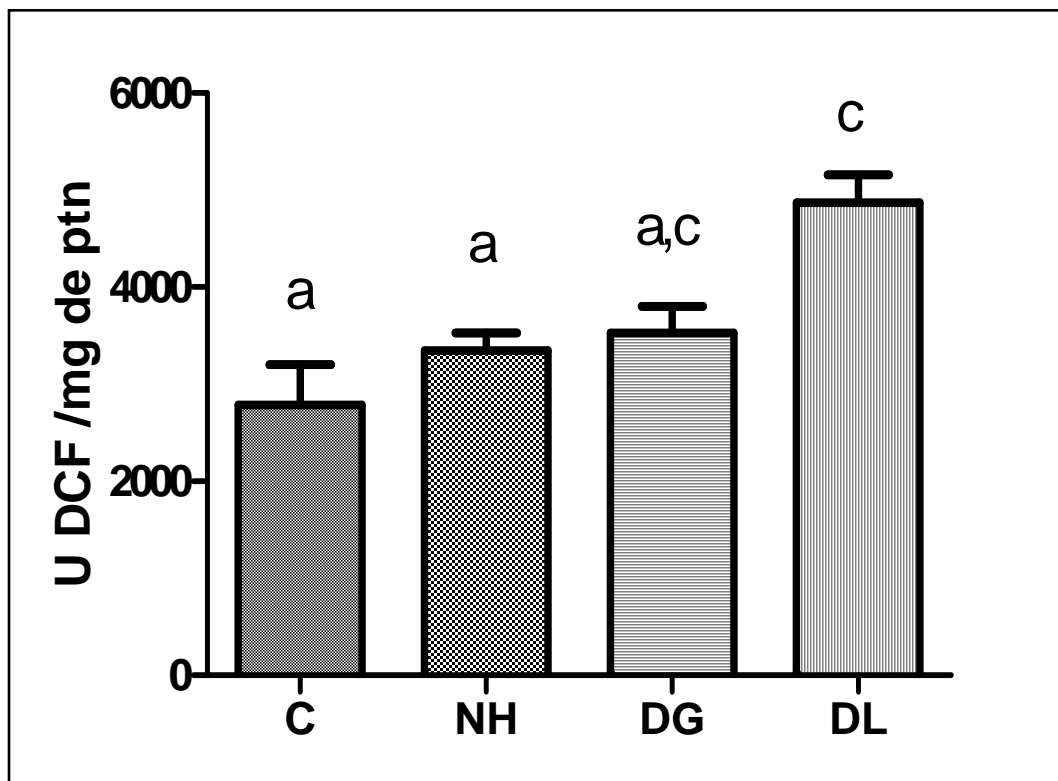


Fig.15: Mostra a produção intracelular de ROS através do método DCF no tecido hepático. Os valores representam media \pm D.P, n= 7 animais/grupo. Diferentes letras apresentam diferença quando comparadas entre si ($p < 0,05$), análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey. Teste realizado em triplicata.

4.14. Medida das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Índice de lipoperoxidação no tecido hepático. Como podemos ver, há diferença significativa dos grupos DG e DL em relação entre os grupos NH e C.

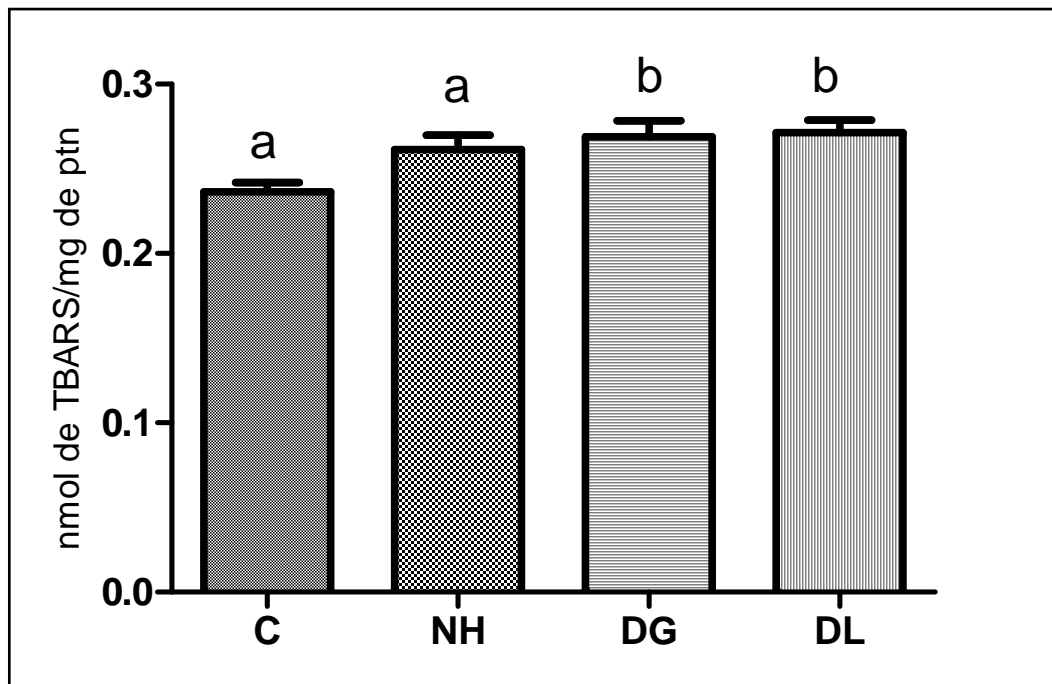


Fig.16: Mostra a medida da lipoperoxidação lipídica no fígado. Os valores representam média \pm D.P, n= 7 animais/grupo. Análise realizada através de ANOVA de uma via seguido de teste de múltipla amplitude de Tukey. Teste realizado em duplicata.

PARTE III

DISCUSSÃO

Neste estudo mostramos a relação que a desnutrição protéico fetal e perinatal somada à dieta hiperlipídica tem com a disfunção no metabolismo lipídico, no metabolismo dos carboidratos, estresse oxidativo e possível degeneração neural.

Os diversos sistemas do nosso organismo dependem, de forma essencial, de uma nutrição adequada para o seu desenvolvimento e funcionamento pleno. O fígado é o órgão central na regulação do metabolismo lipídico, atuando na síntese de triglicerídeos, colesterol e lipoproteínas circulantes. Em ratos, a desnutrição ocasiona uma diminuição na concentração de triglicerídeos plasmáticos, que foi relacionada com o aumento destes lipídeos no fígado (MADANI et al, 2000).

A fim de elucidar tal relação, verificamos os efeitos de uma dieta hiperlipídica no pós-desmame, sob modelos experimentais de desnutrição gestacional ou lactacional, em algumas vias do metabolismo intermediário, bem como o dano oxidativo ocasionado nestes animais. Há muitos estudos sobre programação, no entanto, poucos pesquisadores analisaram separadamente os efeitos de uma desnutrição protéica da prole em diferentes janelas críticas de exposição, gestação e lactação, somada a uma dieta hiperlipídica no pós-desmame.

O TTG foi realizado com o intuito de verificar se o nosso protocolo experimental foi hábil em induzir intolerância à glicose nos animais (Fig.3). A prole alimentada com dieta hiperlipídica apresentou maior glicemia em relação ao controle, após a administração de glicose. No entanto, a dieta hiperlipídica somada a uma restrição protéica durante a gestação ou lactação, mostrou-se ainda mais significativa em relação ao controle, demorando mais tempo para metabolizar a glicose, demonstrando ser menos tolerante a ação da mesma.

Como pode ser observado na tabela 1 não houve diferença significativa entre os pesos dos animais ao nascimento, o que contrasta com a maioria dos estudos sobre desnutrição protéica durante a gestação (HALES et al, 1991; BAKER et al, 1993; DESAI, 1996; RAVELLI et al, 1998; OZZANE SE, 2003), nos quais o peso ao nascer é menor. Como podemos verificar também, os animais tratados com dietas hiperlipídicas após o período gestacional, quando desnutridos na gestação, mesmo não ganhando maior peso corporal, sofrem maior acúmulo de tecido adiposo retroperitoneal e epididimal. Já os animais desnutridos na lactação, conforme postulado na literatura (OZANNE et al, 1996; ZAMBRANO et al, 2005), não conseguem recuperar o peso, mesmo recebendo uma dieta hiperlipídica após este período. Em relação ao tamanho do fígado dos animais, não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. A normalização do tamanho do fígado não necessariamente indica uma recuperação de sua função: em animais de 11 meses que sofreram desnutrição durante o período gestacional e após receberam dieta normoprotéica, uma diminuição da atividade da enzima hepática glicocinase foi verificada, bem como, um aumento significativo na atividade da PEPCCK, conforme descrito por Desai et al (1997). Já os rins dos animais desnutridos na gestação e lactação mostraram-se com menor peso em relação aos grupos que não sofreram restrição protéica, concordante com estudos prévios (LANGLEY-EVANS SC, WELHAM SJ, JACKSON AA 1999; HOET JJ et al, 2000). Além desse dado, pesquisadores têm demonstrado recentemente uma diminuição do número de néfrons e na função renal, embora não necessariamente no peso do tecido renal (CHANTAL C, 2007; HARRISON M. & LANGLEY-EVANS SC, 2009).

Ao analisar os dados da tabela 2, verificamos que os níveis de glicose e de insulina plasmáticos dos ratos desnutridos no período gestacional, tratados com dietas hiperlipídicas dos 30 aos 120 dias de tratamento, indicam que estes animais tornaram-se hiperglicêmicos e

hiperinsulinêmicos, condição normal na resistência à insulina. Comparando com o grupo NH, normonutrido nos períodos gestacional e lactacional, houve um aumento significativo da insulina plasmática em ambos os grupos desnutridos. Holness & Sugden (1999), mostraram em estudos *in vivo* que adipócitos isolados de ratos desnutridos, com 5 meses de idade, exibiram utilização aumentada de glicose em resposta à 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 do mesmo hormônio. Isto sugere que a partir de um determinado momento, estes animais se tornarão hipoinsulinêmicos. Através de estudos prévios foi mostrado que o insulto provocado pela restrição protéica durante o período gestacional e lactacional, aumenta a ação da insulina, apesar de sua secreção prejudicada, mantendo assim uma tolerância normal à glicose. No entanto, a ingestão de uma dieta hiperlipídica leva a um prejuízo na ação periférica da insulina, sem afetar a tolerância à glicose, em consequência do aumento da secreção de insulina (HOLNESS et al, 1996). Contudo, a exposição crônica a ambas as intervenções dietéticas (desnutrição somada a uma subsequente dieta hiperlipídica), 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 intolerância à glicose (HOLNESS et al, 2000).

Ainda, verificamos que no grupo desnutrido na lactação (DL) houve um aumento considerável de ácidos graxos livres (AGL) no plasma. O fluxo dos ácidos graxos livres para o fígado pode prejudicar o metabolismo deste órgão, conduzindo ao aumento da produção hepática de glicose. Observamos também que os grupos desnutridos na gestação (DG) e na lactação (DL) apresentaram um aumento nos níveis de colesterol e triglicerídeos hepáticos e colesterol plasmático apenas em relação ao grupo controle. Nossa observação de

armazenamento de triglicérides em ratos alimentados com dieta hiperlipídica é coerente com a teoria lipostática da obesidade, a qual postula que a diminuição da ação da insulina no tecido adiposo causa acúmulo de triglicérides fisiopatológicos em outros tecidos como, por exemplo, o fígado, levando a alterações metabólicas como a esteatose hepática (THOMPSON NM et al, 2007).

Está bem estabelecido que a supressão da produção hepática de glicose encontra-se diminuída no DMII. Este fenômeno poderia resultar do aumento da gliconeogênese e/ou glicogenólise. Os mecanismos propostos para o aumento da gliconeogênese incluem aumento dos níveis circulantes de seus precursores (lactato, alanina, glicerol) (CONSOLI et al, 1989), de AGL (STAEHR et al, 2003) e de glucagon (BARON et al, 1987). A atividade da fosfenolpiruvato-carboxiquinase citosólica (PEPCKc) hepática na prole aos 4 meses de tratamento (Fig.4) está significativamente aumentada nos grupos que receberam dieta hiperlipídica, corroborando com o previamente sugerido na literatura.

Alguns dos genes que são alterados seguindo estímulo ambiental pré e pós-natal são fatores de transcrição que afetam vias metabólicas (BURDGE GC. et al, 2007). Em acordo, Ozanne (2003), constatou que filhotes de mães submetidas à dieta hipoprotéica na gestação têm, aproximadamente, o dobro de atividade da enzima PEPCK. Ademais, o perfil lipídico alterado em filhotes de mães desnutridas na gestação parece ter relação com o aumento da expressão das enzimas acetil Co-A carboxilase e ácido graxo sintase no fígado (OZANNE SE et al, 2003).

Parte do fluxo de metabólitos da via glicolítica segue em direção à formação de piruvato que, transportado para o interior da mitocôndria, é transformado em acetilCoA pela ação da piruvato desidrogenase (PDH); este é acoplado a oxalacetato (OAA) pela ação da citrato sintase (CS), gerando citrato. Parte do citrato é transportado de volta ao citoplasma

onde sofre a ação da enzima ATP-citrato liase (ATP-CL), gerando novamente acetil-CoA. Este sofre ação da enzima acetil CoA carboxilase (ACC), transformando-se em malonil-CoA; esta entra na via de síntese de ácidos graxos, catalizada pela enzima ácido graxo sintase (FAS), formando acilCoA, o qual é utilizado para a esterificação com glicerol-3-P, completando a síntese de TAG, sendo incorporado à gotícula de gordura. Para atuar, a FAS necessita de NADPH₂ como cofator, o qual é fornecido pela via das pentoses e pela ação da enzima málica (EM).

Quando a síntese de TAG ocorre em outros tecidos que não o adiposo pode estar havendo uma disfunção metabólica. O acúmulo de TAG no citoplasma de outras células que não adipócitos permite, como comentado anteriormente, que estes substratos sejam metabolizados levando à formação de produtos como ceramida, que propiciam a ativação da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS), com conseqüente formação de NO e indução do processo de apoptose através da ativação do fator nuclear kB (NFkB).

Na RI e no DMII, a concentração e síntese hepática de glicogênio podem estar diminuídas (GANNON & NUTTAL, 1997), bem como a atividade do complexo enzimático piruvato desidrogenase e da via glicolítica (SCHUMMER et al, 2008). O balanço negativo de carboidrato imposto pela dieta hiperlipídica ocasiona uma redução nos estoques de glicogênio, conseqüentemente favorecendo a oxidação dos lipídios. O excesso de AGL pode diminuir a atividade do complexo PDH, pela alteração da sinalização da insulina e pelo aumento nos níveis plasmáticos dos mesmos. Bajotto et al (2006) sugeriram que o aumento de AGL sérico pode contribuir para inibição da atividade PDH hepática em animais normais bem como em animais diabéticos. Como podemos ver, o grupo DL apresenta quantidade bastante aumentada de AGL em relação aos outros grupos, bem como significativa diminuição da concentração e síntese indireta de glicogênio (Fig. 5 e 6).

As enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase regulam a síntese global de glicogênio. Um defeito principal na síntese de glicogênio estimulada por insulina é um achado característico em indivíduos em estados insulino-resistentes, incluindo obesidade, diabetes e a combinação destes dois (AVOGARO et al, 1996, DEFRONZO, 1997). Elevada atividade hepática da enzima glicogênio fosforilase ocorre em vários modelos animais de resistência à insulina (AISTON et al, 2000) e pode ser, ao menos em parte, responsável pelo prejuízo na síntese global de glicogênio. Somado a isso, a atividade da glicogênio sintase em indivíduos com diabetes tipo II está reduzida e a habilidade da insulina em ativá-la está severamente prejudicada (THORBURN et al., 1990). Os grupos DG e DL mostram bem esse efeito da resistência à insulina sobre o metabolismo do glicogênio documentado pela literatura (Figura 5 e 6).

Pesquisas realizadas em humanos têm demonstrado que o atraso de crescimento intra-uterino pode levar ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no feto (KAROWICZ-BILINSKA et AL, 2002; BOWEN et al, 2001; WANG & WALSH, 2001), juntamente com baixos níveis de oxigênio que levam à insuficiência da cadeia de transporte de elétrons, o que pode aumentar ainda mais produção de ROS (DEGLI E & MCLENNAN, 1998; CHANDEL et al, 1996). O dano oxidativo causado por ERO não se limita à mitocôndria - proteínas, lipídios e ácidos nucleicos no interior da célula também podem ser danificados (JONES RH & OZANNE, 2008).

As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) são as enzimas que desempenham o papel principal como reguladoras da homeostasia redox intracelular.

A SOD age sobre o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), transformando-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). A enzima CAT age sobre o H_2O_2 gerado na reação anterior,

transformando-o em água. Já a GPx também atua sobre a H_2O_2 , no entanto, por outro mecanismo. A GPx participa de um ciclo redox juntamente com a enzima glutathione redutase, na qual a GSH é utilizada, pela GPx, para transformar H_2O_2 em H_2O ; e o NADPH é recrutado pela glutathione redutase para reduzir a glutathione oxidada, na primeira reação, em GSH novamente (BOVERIS, 1998).

O tripeptídeo glutathione (na forma reduzida - GSH) é considerado um dos mais importantes componentes da defesa antioxidante intracelular não-enzimática (HASSPIELER *et al.*, 1994). Como está presente em grande quantidade dentro da célula (0.1-10 mM), é elevada a probabilidade de reagir com espécies reativas de oxigênio (ROS) antes de estas provocarem danos oxidativos (STOREY, 1996). Sendo assim, como resultado de um aumento na velocidade de produção de ROS, se esta se tornar superior à produção de GSH haverá conseqüentemente uma depleção do conteúdo intracelular de GSH. Ainda, Palace & Klaverkamp (1993) consideraram as enzimas anti-oxidantes como excelentes indicadores precoces da susceptibilidade celular à lesão provocada pelo estresse oxidativo.

Em nosso estudo, de acordo com os resultados do DCF (fig. 16 e 10 respectivamente), houve um aumento de RL nos dois tecidos estudados, fígado e córtex, nos grupos DG e DL. Isso levou a uma provável situação de estresse oxidativo que se confirma pela diminuição da principal defesa antioxidante cerebral, a glutathione (fig.9). O cérebro é especialmente vulnerável a ROS, pois é rico em lipídios com ácidos graxos insaturados, alvo da peroxidação lipídica. O cérebro também contém baixa atividade de superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, em comparação com rim ou fígado. No entanto, é capaz de funcionar ao longo da vida humana, indicando a presença de um eficaz sistema antioxidante (PASTORE A *et al.*, 2003). Evidências mostraram que a defesa neuronal contra H_2O_2 é mediada principalmente pelo sistema glutathione (DESAGHER S, *et al.*, 1996). Com efeito, a aplicação

de H_2O_2 aos neurônios provoca a oxidação rápida de GSH. A remoção do peróxido é seguida por uma recuperação quase completa do original GSH / GSSG. No entanto, para a detoxificação rápida de H_2O_2 pelos neurônios, tanto a GPx como a catalase são essenciais. In vivo, os diferentes tipos de células do cérebro estão em contato uns com os outros. Uma intensa troca metabólica ocorre, especialmente entre astrócitos e neurônios. As células astrogliais ajudam a proteger os neurônios contra H_2O_2 , que é o peróxido produzido em maior quantidade no cérebro, e GSH é fundamental para essa função. Na verdade, o efeito protetor das células astrogliais é diminuído quando estas células contêm baixos níveis de GSH (DRINGEN R. et al, 2000). O nível de GSH neuronal depende da disponibilidade de cisteína e, na presença de células astrogliais um precursor da cisteína (CysGly) é fornecido para os neurônios melhorar a síntese de GSH (PASTORE, A et al, 2003).

No fígado, também essa redução é observada (fig.14). O fígado é rico em GSH, pois apresenta uma elevada taxa metabólica e conseqüente produção de espécies reativas de O_2 . Na doença hepática não-alcoólica, a GSH hepática pode ser anormalmente baixa e GSSG alta (PASTORE A et al, 2003). Para remover o H_2O_2 , GSH é oxidada na reação catalisada pela GPx, sendo regenerada às custas de NADPH, novamente em GSH (HALLIWELL, 2006). O fato de não haver diferença entre DG e DL (fig 14), nos leva a acreditar que ambos os períodos - gestação ou lactação - são igualmente prejudicados pela desnutrição. Segundo Park et al (2004), ratas alimentadas com uma dieta deficiente em proteína durante a gestação e lactação dão origem a descendentes com reduzida expressão do gene mitocondrial no fígado, bem como no pâncreas. Além disso, Sparre et al., (2003) mostrou que as ilhotas de Langerhans de fetos de mães alimentadas com baixa concentração proteína, tem alterada expressão gênica de proteínas envolvidas com o metabolismo da glicose, a transferência de energia mitocondrial e metabolismo de DNA e de RNA. É importante também ressaltar que

ambos os grupos sofrem desnutrição protéica, o que inclui deficiência do aminoácido metionina, e uma vez em ratos alimentados com uma dieta deficiente em aminoácidos sulfurados, tem menor concentração hepática de GSH (BRAY TM & TAYLOR, CG, 1994).

O TBARS, o qual mede o nível de peroxidação lipídica, no córtex cerebral (fig.11) não apresentou diferença significativa entre os grupos, estando de acordo com a literatura (BONATTO et al, 2006), que mostrou alteração no cerebelo, no entanto, níveis ainda normais no córtex desses animais. Smart e Dobbing (1971) reportaram que a deprivação protéica em roedores durante a amamentação (período de 3 a 4 semanas após o nascimento) causa algumas alterações no cerebelo, tais como a redução na deposição de mielina, diminuição no número de células e retardo na maturação celular. O cerebelo amadurece principalmente após o nascimento, enquanto o córtex cerebral amadurece principalmente no período pré-natal. Durante a gestação, a má nutrição é mediada pela mãe, o que poderia atenuar os efeitos prejudiciais da dieta restrita em proteína na estrutura cortical (BONATTO et al, 2006). Esse efeito ontogenético poderia explicar a menor atividade da SOD no grupo DL (fig.7), mostrando uma maior suscetibilidade do córtex neste grupo. Já a CAT, mostrou-se significativamente aumentada no grupo DG e diminuída no DL (fig.8), o que poderia significar aumento da produção da H_2O_2 no DG e, no grupo DL, podemos pensar em menor produção de H_2O_2 ou consumo deste por outra via. No entanto, no fígado houve um aumento significativo de TBARS nos grupos DG e DL (fig.16), demonstrando importante peroxidação lipídica neste tecido.

A diminuição significativa verificada na SOD no tecido hepático nos grupos DG e DL (fig.12) pode demonstrar diminuição da produção de superóxido ($O_2^{\bullet-}$), seu efetor alostérico positivo, ou inibição da mesma. Já enzima CAT mostra-se aumentada, agindo sobre o H_2O_2 gerado, transformando-o em água.

A diminuição da SOD no córtex dos grupos DG e DL pode ser explicada, além do efeito ontogenético, por ser a GSH a maior defesa antioxidante do sistema nervoso. Os efeitos mais evidentes das EROs no fígado ocorrem devido a alterações metabólicas que a dieta hiperlipídica somada à desnutrição nos diferentes períodos críticos estudados (gestação e lactação) acarretam e isso vai refletir no principal órgão responsável por isso.

CONCLUSÕES

A nutrição é uma das principais influências para desenvolvimento do feto e do neonato. Neste estudo utilizamos um protocolo que permitiu a identificação de prejuízos específicos em diferentes fases do desenvolvimento – gestação e lactação. A escolha de um desenho experimental com 4 grupos, sendo o controle com dieta nutricionalmente completa durante todo o tratamento, o grupo NH, recebendo esta mesma alimentação durante o período gestacional e lactacional, além dos grupos DG e DL expostos à desnutrição proteica nestes respectivos intervalos, somado, aos 3 últimos grupos dieta hiperlipídica no pós natal (a partir do 30º dia de vida), foi fundamental para tal identificação.

Em resumo, o aumento de lipídios na dieta induz à resistência à insulina e ao estresse oxidativo, no entanto, o sinergismo de ambas as intervenções, restrição protéica somada à dieta hiperlipídica, mostrou-se ainda mais nocivo. Ambas as intervenções agravaram ainda mais tais condições como podemos verificar através do aumento da insulina, colesterol e ácidos graxos livres no plasma, bem como, a peroxidação lipídica e os radicais livres no fígado, além da diminuição da concentração do glicogênio e GSH hepático. Simultaneamente, no córtex cerebral ocorreu um aumento das espécies reativas de oxigênio, demonstrada pelo DCF e uma diminuição da principal defesa antioxidante no cérebro, a GSH. Nosso estudo foi importante ao demonstrar uma correlação positiva entre restrição protéica durante o desenvolvimento inicial, dieta hiperlipídica, disfunção no metabolismo de glicose, estresse oxidativo e dano cerebral.

PERSPECTIVAS

φ Investigar neuroinflamação e neurodegeneração causados pela deficiência de proteína e uma dieta hiperlipídica em córtex cerebral;

φ Analisar se este tratamento é capaz de induzir comportamento tipo-ansiedade;

φ Avaliar o comportamento tipo-depressão, além de investigar a capacidade de aprendizado e memória nestes animais (os quais são características em comum entre neurodegeneração e Alzheimer);

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIELS M. et al. Diabetic dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol.* 2006 Jun; 17(3):238-46.
- AEBI H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121
- AHMED M.H. Invasive and non-invasive investigations for non-alcoholic steatohepatitis: the benefit of histology. *Scand J Gastroenterol.* 2005 Oct;40(10):1260.
- ALBERS J.W. et al. Subclinical neuropathy among Diabetes Control and Complications Trial participants without diagnosable neuropathy at trial completion: possible predictors of incident neuropathy? *Diabetes Care*, 30: 2613-2618, 2007.
- ARMITAGE J.A. et al. Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. *Front Horm Res.*, 36:73-84. Review. 2008
- AVOGARO A. et al. Epinephrine exerts opposite effects on peripheral glucose disposal and glucose-stimulated insulin secretion. A stable label intravenous glucose tolerance test minimal model study. *Diabetes.* 1996 Oct;45(10):1373-8.
- BANNISTER J.V., CALABRESE L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 32:279. 1987;
- BARNES P.J., KARIN M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066–1071.
- BAYNES J.W., Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 1999 Jan;48(1):1-9.
- BECKMAN J.A., CREAGER M.A. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA.* 2002 May 15;287(19):2570-81.
- BERLETT B.S., STADTMAN E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.*;272(33):20313-6. 1997;
- BIESWAL F. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)*;14(8):1330-43. 2006;
- BODEN, G., CARNEL, L. H. Nutritional effects of fat on carbohydrate metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17(3), 399-410; 2003.
- BONATTO F. et al. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res.*;1042(1):17-22. 2005;
- BONATTO F. et al. Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum. *Neurosci Lett.* 2006 Oct 9;406(3):281-4. Epub 2006 Aug 22.
- BRAY T.M. TAYLOR C.G. Enhancement of tissue glutathione for antioxidant and immune functions in malnutrition. *Biochem. Pharmacol.* 47; 2113-2123; 1994.

BRONFMAN M., MORALES M.N., ORELLANA A. Diacylglycerol activation of protein kinase C is modulated by long-chain acyl-CoA. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152: 987–992.

BROWNE R. W., ARMSTRONG D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347–352; 1998;

BROWNLEE M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.

BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1615-25.

BUETTNER R., SCHÖLMERICH J., BOLLHEIMER L.C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Apr;15(4):798-808.

BURDGE GC, et al. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr*. 2007; 97(6):1036-46.

CAI W. et al. Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Mol Med*. 2002 Jul;8(7):337-46.

CARPENTIER A. et al. Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 2000;49:399–408

CARVALHEIRA J.B. et al. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia*. 2003 Dec;46(12):1629-40.

CERF M.E. High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. *Medical Science Monitor: International medical journal of experimental and clinical research*, 13: RA12-7, 2007.

COTTRELL E.C, OZANNE S.E,. Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiol Behav* 22;94(1):17-28. 2007

DANDONA P. et al. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 355–362.

DE LA MONTE et al. Epidemiological Trends Strongly Suggest Exposures as Etiologic Agents in the Pathogenesis of Sporadic Alzheimer's Disease, Diabetes Mellitus, and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *J Alzheimers Dis*, 17(3):519-529, 2009;

DE LA MONTE et al. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 10, 89-109; 2006;

- DEFRONZO R.A. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*. 1988 Jun;37(6):667-87.
- DEFRONZO R.A. Use of the splanchnic/hepatic balance technique in the study of glucose metabolism. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1987 Nov;1(4):837-62.
- DELGADO J.S. Evolving trends in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Intern Med* 2008, 19(2):75-82. 2008;
- DENT P. et al. The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle. *Nature*. 1990 Nov 22;348(6299):302-8
- DESPRÉS J.P., LEMIEUX I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):881-7.
- DOBBINS R. L. et al. Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. *Diabetes*. 2001 Jan;50(1):123-30.
- DOBBINS R.L. et al. The composition of Dietary Fat Directly Influences Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Rats. *Diabetes* 51, 1825-1833. 2002.
- DOLNIKOFF M. et al. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Internacional Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 25: 426-433, 2001.
- DRAPER H.H., HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol*;186:421–31, 1990.
- ERHUMA A. et al. Prenatal exposure to undernutrition and programming of responses to high-fat feeding in the rat. *Br J Nutr*. 2007 Sep;98(3):517-24. Epub 2007 Apr 19.
- FAROUQUE H.M., O'BRIEN R.C., MEREDITH I.T. Diabetes mellitus and coronary heart disease--from prevention to intervention: Part I. *Aust N Z J Med*. 2000 Jun;30(3):351-9.
- FEOLI A. M. et al. Effects of maternal protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Neuroscience Letters* 406, 281-284. 2006
- FEOLI A. M. et al. Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils. *Nutrition*. 2003 Sep;19(9):789-93.
- FERRANNINI E. et al. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest* 1983;72:1737–1747
- FINKEL T., HOLBROOK N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000 Nov 9;408(6809):239-47.
- FORBES S. et al. Impaired circulating glucagon-like peptide-1 response to oral glucose in women with previous gestational diabetes *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 Jan;62(1):51-5.

- FRAYN K. N. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*. 2002 Sep;45(9):1201-10. Epub 2002 Jul 24.
- FRIBERG E. et al. Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Diabetologia*, 50: 1365-1374, 2007.
- GEDIK C.M. et al. Effects of age and dietary restriction on oxidative DNA damage, antioxidant protection and DNA repair in rats. *European Journal of Nutrition*, 44: 263-272, 2005.
- GHOSH S., BALTIMORE D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature* 1990; 344: 678–682.
- GIOVANNUCCI E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *Journal of Nutrition*, 131: 3109S-3120S, 2001.
- GLASS CK, WITZTUM JL. Atherosclerosis, the road ahead. *Cell* 2001; 104: 503–516.
- GLUCKMAN P.D, HANSON M.A. The Developmental origins of the metabolic syndrome. *Endocrinol Metab.*,15(4):183-7. Review.
- GRIFFIN M.E. et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 1999; 48: 1270–1274.
- HAKIMI P. et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism. *Nutr Metab (Lond)*. 2005 Nov 21;2:33.
- HALES C.N. OZANNE S.E. The dangerous road of catch-up growth. *J Physiol*. 2003 Feb 15;547(Pt 1):5-10. Epub 2002 Aug 2.
- HAMELET J. et al. Cystathionine beta synthase deficiency induces catalase-mediated hydrogen peroxide detoxification in mice liver. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jul-Aug;1782(7-8):482-8.
- HAMELET J. et al. Hyperhomocysteinemia due to cystathionine beta synthase deficiency induces dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis in mice. *J Hepatol*;46:151–9, 2007.
- HIROSUMI J. et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002 Nov 21;420(6913):333-6.
- HO E.C., LAM K.S., CHEN Y.S., YIP J.C., ARVINDAKSHAN M., YAMAGISHI S., YAGIHASHI S., OATES P.J., ELLERY C.A., CHUNG S.S., CHUNG S.K. Aldose reductase-deficient mice are protected from delayed motor nerve conduction velocity, increased c-Jun NH2-terminal kinase activation, depletion of reduced glutathione, increased superoxide accumulation, and DNA damage. *Diabetes* 55:1946 –1953, 2006

- HOET J.J., OZANNE S, REUSENS B. Influences of pre- and postnatal nutritional exposures on vascular/endocrine systems in animals. *Environ Health Perspect.* 2000 Jun;108 Suppl 3:563-8.
- HOUNSOM L., CORDER R., PATEL J., TOMLINSON D.R. Oxidative stress participates in the breakdown of neuronal phenotype in experimental diabetic neuropathy. *Diabetologia* 44:424–428, 2001
- HUEBSCHMANN A.G., Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care.* 2006 Jun;29(6):1420-32.
- ITANI S.I. et al. Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. *Diabetes* 2000; 49: 1353–1358.
- ITANI S.I., et al. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 2002; 51: 2005–2011.
- KELLEY D.E. et al. Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Oct;285(4):E906-16.
- KHAN IY et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288, 27-133. 2004
- KHAN IY et al. Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring. *Circulation*.110, 1097-102. 2004.
- KODL C.T., SEAQUIST E.R. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocrine Reviews*, 29: 494-511, 2008.
- KOHEN R., NYSKA A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*;30:620–50, 2002.
- KUBOW S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology & Medicine*, 12: 63-81, 1992.
- LAM T.K. et al. Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat Med.* 2005 Mar; 11(3):320-7.
- LANGLEY-EVANS S.C., WELHAM S. J., JACKSON A. A. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci* 64:965-974, 1999.
- LAUNER L. J. Next steps in Alzheimer's disease research: interaction between epidemiology and basic science. *Curr Alzheimer Res* 2007, 4(2):141-143. 2007;
- LEAN M.E. et al. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes*, 48: 176-181, 1999.

- LEE Y, et al. Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J Biol Chem*. 2001 Feb 23;276(8):5629-35. Epub 2000 Nov 28.
- LEVINE R.L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 1990;186:464–78.
- LINGOHR M.K. et al. Dichloroacetate stimulates glycogen accumulation in primary hepatocytes through an insulin-independent mechanism. *Toxicol Sci*. 2002 Aug;68(2):508-15.
- LO T.W. et al. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem*. 1994 Dec 23;269(51):32299-305.
- LOWRY O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*;193:265. 1951;
- MACDONALD G.A. et al. Lipid peroxidation in hepatic steatosis in humans is associated with hepatic fibrosis and occurs predominately in acinar zone 3. *J Gastroenterol Hepatol* 16: 599–606; 2001;
- MARSHALL J.A., HAMMAN R.F., BAXTER J. High-fat, low-carbohydrate diet and the etiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus: the San Luis Valley Diabetes Study. *American Journal of Epidemiology*, 134: 590-603, 1991.
- MATSUZAWA-NAGATA N. et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*. Aug;57(8):1071-7, 2008.
- MAY. Q. et al. Association of two apolipoprotein A-I gene MspI polymorphisms with high density lipoprotein (HDL)-cholesterol levels and indices of obesity in selected healthy Chinese subjects and in patients with early-onset type 2 diabetes. *Clinical Endocrinology (Oxf)*, 59: 442-449, 2003.
- MCGARRY J.D. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 51(1):7-18. Jan. 2002.
- MCMILLEN I.C. et al. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptual and foetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102,82-9. 2008.
- MIYATA T., ISHIKAWA N., VAN YPERSELE DE STRIHOUC. Carbonyl stress and diabetic complications. *Clin Chem Lab Med*. 41(9):1150-8. Set 2003.
- MONNIER V.M., CERAMI A. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science*. 211(4481):491-3. Jan 1981.
- MOROZ N. et al. Limited Alzheimer-type neurodegeneration in experimental obesity and Type 2 diabetes mellitus. *J. Alzheimers Dis.*, 15, 29-44. 2008;

- MORTON G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*.;443(7109):289-95. Set. 2006.
- MÜLLER S., RONFANI L., BIANCHI M.E. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J Intern Med*. 255(3):332-43. Mar. 2004.
- NARAYAN K.M. et al. Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. *JAMA*.290(14):1884-90. Out. 2003.
- NISHIZUKA Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9: 484–496. 1995.
- NUGENT C., YOUNOSSi Z.M. Evaluation and management of obesity-related nonalcoholic fatty live disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 4(8):432-441, 2007;
- OAKES N.D. et al. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes*. 46(11):1768-74. Nov. 1997.
- OBROSOVA I.G., MABLEY J.G., ZSENGELLER Z., CHARNIAUSKAYA T., ABATAN O.I., GROVES J.T., SZABO C. Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy: evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst. *FASEB J* 19:401– 403, 2005
- OLIVEIRA, G.T. E DA SILVA, R.S.M. *Comp. Biochem.Physiol*. 118, 1429-1435.1997.
- OZANNE S.E. et al. Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol*. 177(2):235-41, Mai. 2003
- PATTI M. E. Gene expression in the pathophysiology os type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diab. Rep* 4(3), 176-181. 2004.
- PECKHAM S.C., ENTENMAN C., CARROL H.W. The influence of a hypercaloric diet on gross body and adipose tissue composition in the rat. *J Nutr*. 77:187-97. Jun 1962.
- PETRIK J. et al. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology*. 140(10):4861-73. 1999.
- PETRY C.J., OZANNE S.E. Effects of maternal iron restriction in the rat on blood pressure, glucose tolerance, and serum lipids in the 3-month-old offspring. *Metabolism*.50(5):562-7. 2001.
- PHILLIPS D.I. et al. Intramuscular triglyceride and muscle sensitivity: evidence for a relationship in non diabetic subjects. *Metabolism* 45:947–950; 1996;
- PICHON L. et al. A high-protein, high-fat, carbohydrate-free diet reduces energy intake, hepatic lipogenesis, and adiposity in rats. *J Nutr*. 136(5):1256-60. Mai. 2006.

POCAI A. et al. Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats. *J Clin Invest.* 116(4):1081-91. Abr. 2006.

PRADA P.O. et al. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia.* 50(9):1949-59. Set. 2007.

PUOANE T. et al, Obesity in South Africa: the South African demographic and health survey. *Obes Res.* 2002 Oct;10(10):1038-48.

PURVES T., MIDDLEMAS A., AGTHONG S., JUDE E.B., BOULTON A.J., FERNYHOUGH P., TOMLINSON D.R. A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J* 15:2508 –2514, 2001

QUINCOZES-SANTOS et al. Atypical neuroleptic risperidone modulates glial functions in C6 astroglial cells; *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:11–15. 2009;
QUINCOZES-SANTOS et al. The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotox Res* 16:30–41.2009;

RAVAL A.P. et al. Protein kinase C delta cleavage initiates an aberrant signal transduction pathway after cardiac arrest and oxygen glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab.*;25(6):730-41, Jun. 2005.

RAVAL J. et al. Basal reactive oxygen species determine the susceptibility to apoptosis in cirrhotic hepatocytes. *Free Radic Biol Med*;41:1645–54, 2006.

REAVEN G.M. Are insulin resistance and/or compensatory hyperinsulinemia involved in the etiology and clinical course of patients with hypertension? *Int J Obes Relat Metab Disord. Suppl 1*:S2-5, Mai. 1995.

RECTOR et al. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol*; 14(2):185-192. 2008.

ROSSI-ESPAGNET A., GOLDSTEIN G.B., TABIBZADEH I. Urbanization and health in developing countries: a challenge for health for all. *World Health Stat Q.*44 (4):185-244, 1991.

ROYTBLAT L. et al. Raised interleukin-6 levels in obese patients. *Obes Res.* 8(9):673-5, Dez 2000.

RUSSELL A.P. Lipotoxicity: the obese and endurance-trained paradox. *Int J Obes Relat Metab Disord.*28 Suppl 4:S66-71. Dez. 2004.

SAUTER N.S. et al. The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. *Endocrinology*, 149: 2208-2218, 2008.

SCHMITZ-PEIFFER C. et al. Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. *Diabetes*, 46: 169–178, 1997.

SEPPÄLÄ-LINDROOS A. et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(7):3023, Jul 2002.

SIEMELINK M. et al. Dietary fatty acid composition during pregnancy and lactation in the rat programs growth and glucose metabolism in the offspring. *Diabetologia*, 45(10):1397-403. 2002.

SLIM R.M. et al Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats. *J Am Coll Nutr*;15:289–94,1996.

SMYTH S., HERON A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature Medicine*, 12: 75-80, 2006.

SUGANAMI T., NISHIDA J., OGAWA Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(10):2062-8, 2005.

TARGHER G. et al. Increased plasma markers of inflammation and endothelial dysfunction and their association with microvascular complications in Type 1 diabetic patients without clinically manifest macroangiopathy. *Diabet Med.* (8):999-1004. Ago. 2005.

TERAUCHI Y. et al. Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 117(1):246-57. Jan. 2007.

TESFAYE S, KEMPLER P. Painful diabetic neuropathy. *Diabetologia*, 48: 805-807, 2005.

THIEBAUD D. et al. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes*, 52:2461–2474, 2003.

THOMPSON A.L., COONEY G.J. Acyl-CoA inhibition of hexokinase in rat and human skeletal muscle is a potential mechanism of lipid-induced insulin resistance. *Diabetes*, 49: 1761–1765, 2000.

THORBURN A.W. et al. Intracellular glucose oxidation and glycogen synthase activity are reduced in non-insulin-dependent (type II) diabetes independent of impaired glucose uptake. *J Clin Invest.*, 85(2):522-9. Feb 1990.

TIEHUIS A.M. et al. Cerebral perfusion in relation to cognitive function and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 51: 1321-1326, 2008.

UNGER R.H., ORCI L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, Suppl 4:S28-32. Nov. 2000.

VELHO G et al. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J Clin Invest.* 98(8):1755-61, Out 1996.

- WALKER M. Obesity, insulin resistance, and its link to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 44(9 Suppl 3):18-20. Set. 1995.
- WANG H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;27:612–6.
- WANG Q. et al. Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. *Hepatology*. Dez. 2008.
- WANG X.P., DING H.L. Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. *Neurosci Bull* 2008, 24(2):105-109.
- WILLIAMSON J.R., KREISBERG RA, FELTS PW. Mechanism for the stimulation of gluconeogenesis by fatty acids in perfused rat liver. *Proc Natl Acad Sci US A*. 56:247–254, 1966.
- WINZELL M.S., AHREN B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, 53 Suppl 3: S215-219, 2004.
- XU H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 112(12):1821-30, Dez. 2003.
- YANG J. et al. Leucine regulation of glucokinase and ATP synthase sensitizes glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 55(1):193-201. Jan, 2006.
- YKI-JÄRVINEN H. et al. Regulation of plasma PAI-1 concentrations in HAART-associated lipodystrophy during rosiglitazone therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23(4):688-94. Abr. 2003.
- YU C. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*; 277: 50230–50236, 2002.
- ZAMBRANO E. et al. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol*. 2006 Feb 15;571(Pt 1):221-30, Dez. 2005.