

Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes  
Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental

**“Influência da hiperalimentação na lactação  
sobre o processo de estímulo-secreção  
de insulina *in vitro*”**

Alessandra Cordeiro de Souza Rodrigues Cunha

Rio de Janeiro

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes  
Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental

**“Influência da hiperalimentação na lactação  
sobre o processo de estímulo-secreção  
de insulina *in vitro*”**

Alessandra Cordeiro de Souza Rodrigues Cunha

Dissertação submetida ao curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Orientador: Professor Dr. Anibal Sanches Moura**

Rio de Janeiro

2007

ii

## FICHA CATALOGRÁFICA

Cunha, ACS

Influência da hiperalimentação na lactação sobre o processo de estímulo-secreção de insulina *in vitro*. Alessandra Cordeiro de Souza Rodrigues Cunha. xviii, 52 p.

Orientador: Anibal Sanches Moura

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Programação metabólica. 2. Sinalização da insulina. 3. GLUT-2. I. Anibal Sanches Moura II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental III. Título.

Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes  
Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental

**“Influência da hiperalimentação na lactação  
sobre o processo de estímulo-secreção  
de insulina *in vitro*”**

Alessandra Cordeiro de Souza Rodrigues Cunha  
Orientador: Professor Dr. Anibal Sanches Moura

Dissertação avaliada em 26 de Junho de 2007 pela banca examinadora:

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Prof. Dr. Gilson Teles Boaventura

Prof. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos

Prof. Dr<sup>a</sup>. Carmen Cabanelas de Moura (Suplente)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Érica Patrícia Garcia de Souza (Suplente)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Rosely Sichieri (Revisora)

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Fisiologia da Nutrição e do Desenvolvimento pertencente ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, sob a orientação do professor Dr. Aníbal Sanches Moura e na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Ao meu esposo, Paulo Roberto, pelo amor, companheirismo e paz.  
À minha mãe, Sônia, que sempre me dizia:  
" Volta pro laboratório de Fisiologia!"  
Ao meu pai, Alcir, por ser um referencial de força e determinação.  
À minha querida irmã Aline que passaria outras noites acordada se preciso fosse.  
Às alunas Ana Carolina, Evelyn, Fabiana, Patrícia e Vivian pelo interesse científico,  
vocês são as sementes que resultarão em uma árvore frondosa.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus criador dos Céus e da Terra pelo direcionamento até aqui.

Aos meus pais e a minha irmã pela compreensão e apoio, principalmente, neste período em que foi preciso voltar a ser estudante.

Ao meu esposo pelo incentivo através da leitura de meus textos e por concatenar minhas idéias.

Ao professor Dr. Anibal Sanches Moura, sou grata por me despertar para o meio científico quando eu ainda cursava o 2º período da graduação desta universidade e por me aceitar de volta ao seu laboratório para a realização deste trabalho.

À Elfa Cardoso e demais irmãos na fé: através de suas orações pude usufruir de um dos frutos do espírito – Perseverança.

Aos professores Patrícia Helena, Dr<sup>a</sup>. Célia Lopes, Dr<sup>a</sup>. Vera Bastos, Dr<sup>a</sup>. Érica Patrícia Garcia, Dr<sup>a</sup>. Cely Saba e à secretária Amélia Gomes, que surgiram em tempo oportuno em minha vida profissional, trazendo consigo, além de talento, generosidade. Quero ainda destacar o professor Mário José dos Santos Pereira pelo apoio em minhas análises estatísticas.

À professora Dr<sup>a</sup>. Rosely Sichieri por aceitar ser a revisora desta dissertação e aos professores da banca examinadora.

A grande equipe de técnicos, bioteristas, alunos e professores dos institutos de Biologia Roberto Alcântara Gomes e de Medicina Social. Obrigada por compartilharem parte de seu tempo e conhecimentos.

Também agradeço a José Aroldo Filho, Paula Paraguaçu, Tatiana Mattos, Rita, Helena Galvão, Mariana Renovato, Cristiano Nascimento, Marcos Borges, Roosevelt, Lin, Aline, Regina, Luciene Pires, Isabela Bonomo, João e Ananda Lages por me auxiliarem em questões envolvendo técnicas laboratoriais. Enfim, agradeço a todos os mestrandos e doutorandos que direta ou indiretamente colaboraram.

Gisele Maciel sua companhia tornou minha rotina mais alegre. “Em todo tempo ama o amigo; e na angústia nasce o irmão” (Provérbios 17.17).

À Renata Pereira minha admiração: Você é um dos exemplos de que vale a pena investir em educação neste país.

Aos órgãos de apoio financeiro à pesquisa: CAPES, CNPQ e FAPERJ.

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg: Micrograma  
µl: Microlitro  
µUI: Microunidade internacional  
ACC: Acil-CoA Carboxilase  
ADP: Adenosina difosfato  
AGL: Ácidos Graxos Livres  
AgRP: Peptídeo Agouti-Relacionado  
AKT: Proteína quinase B  
AMPK: *AMP-activated protein Kinase*  
ATP: Adenosina trifosfato  
C: Celsius  
CoA: Coenzima A  
dl: decilitro  
DM2: Diabetes Mellitus tipo 2  
FADH<sub>2</sub>: Flavina Adenina Dinucleotídeo reduzido  
FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*  
FAS: Ácido Graxo Sintase  
g: grama  
GLUT2: Transportador de Glicose tipo 2  
GLUT4: Transportador de Glicose tipo 4  
GSK3: Kinase da Glicogênio-sintase  
HDL: Lipoproteína de alta densidade  
i.p.: Intraperitoneal  
IRS1: Substrato do Receptor de Insulina 1  
IRS2: Substrato do Receptor de Insulina 2  
K-Da: Quilodalton  
Kg: Quilograma  
Km: Constante Michaelis-Mentem  
L: Litro  
LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LPL: Lipoproteína lipase  
mA: Miliamper  
mg: Miligrama  
ml: Mililitro  
mM: Milimolar  
mmol: Milimol  
mTOR: *Mammalian Target of Rapamicyn*  
N: Normal  
NADHH+: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido  
NC: Ninhada controle  
nm: Nanômetro  
NPY: Neuropeptídeo Y  
NR: Ninhada reduzida  
pH: Potencial hidrogeniônico  
PI3K: Fosfoinositídeo 3-quinase  
PKA: Proteína Quinase A  
POMC: Proopiomelanocortina  
PTP1B: Proteína Tirosina-Fosfatase 1B  
rpm: Rotação por minuto  
SREBP: *Sterol Regulatory element-binding proteins*  
U: Unidade  
V: Volts  
VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade  
V<sub>máx</sub>: Velocidade máxima

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Processo de estímulo-secreção de insulina pela célula $\beta$ pancreática .....	8
<b>Figura 2:</b> Vias de sinalização da insulina relacionadas ao metabolismo energético .....	9
<b>Figura 3:</b> Ação da insulina nos neurônios hipotalâmicos relacionados ao consumo de alimentos.....	9
<b>Figura 4:</b> Estimativa do consumo de leite de ratas Wistar .....	27
<b>Figura 5:</b> Quantidade de macronutrientes do leite de ratas Wistar .....	27
<b>Figura 6:</b> Curva de crescimento naso-anal .....	28
<b>Figura 7:</b> Regressão linear referente ao crescimento naso-anal .....	28
<b>Figura 8:</b> Curva de ganho de peso corporal na fase de crescimento .....	29
<b>Figura 9:</b> Curva de ganho de peso corporal na fase adulta.....	29
<b>Figura 10:</b> Regressão linear referente ao ganho de peso corporal na fase de crescimento .....	29
<b>Figura 11:</b> Regressão linear referente ao ganho de peso corporal na fase de adulta .....	29
<b>Figura 12:</b> Consumo alimentar de ratos Wistar adultos .....	30
<b>Figura 13:</b> Áreas das curvas representativas do consumo alimentar.....	30
<b>Figura 14:</b> Índice de Lee .....	31
<b>Figura 15:</b> Gordura retroperitoneal .....	31
<b>Figura 16:</b> Proteínas da carcaça.....	31
<b>Figura 17:</b> Glicemia .....	32
<b>Figura 18:</b> Insulinemia .....	32
<b>Figura 19:</b> Lipidograma.....	32
<b>Figura 20:</b> Insulinemia/ glicemia .....	33
<b>Figura 21:</b> Teste de Tolerância à Glicose.....	33
<b>Figura 22:</b> Secreção de insulina <i>in vitro</i> .....	34
<b>Figura 23:</b> Área da curva representativa da Secreção de insulina <i>in vitro</i> .....	34
<b>Figura 24:</b> Expressão de GLUT2 .....	35
<b>Figura 25:</b> Expressão de AKT.....	35

## LISTA DE REAGENTES

3,3-diaminobenzidina tetrahidroclorato – DAB (Sigma®, EUA)  
Ácido pícrico saturado (Qeel®, Brasil)  
Ácido tricloroacético (Vetec®, Brasil)  
Albumina soro bovina (Merck®, Alemanha)  
Anti-AKT de coelho (Santa Cruz®, EUA)  
Anti-Glut2 de coelho (Santa Cruz®, EUA)  
Aprotinina (Sigma®, EUA)  
Bicarbonato de sódio (Merck®, Brasil)  
Carbonato de sódio (Synth®, Brasil)  
Carbonato de sódio (Vetec®, Brasil)  
Clorato de cálcio (Grupo química®, Brasil)  
Clorato de magnésio (Vetec®, Brasil)  
Clorato de potássio (Reagen®, Brasil)  
Clorato de sódio (Vetec®, Brasil)  
Colagenase (Worthington®, EUA)  
Deoxicolato de sódio (Vetec®, Brasil)  
Dodecil sulfato de Sódio (USB®, EUA)  
EDTA (Sigma®, Brasil)  
Fluoreto de fenilmetilsulfonil – PMSF (Sigma®, EUA)  
*Folin-ciocalteus phenol* (Merck®, Alemanha)  
Fosfato de potássio (Vetec®, Brasil)  
Fosfato de sódio (Merck®, Brasil)  
Glicose (Vetec®, Brasil)  
Hepes (Sigma®, EUA)  
Hidróxido de potássio (Reagen®, Brasil)  
Hidróxido de sódio (Reagen®, Brasil)  
Lactose (DiFCO®, EUA)  
Leite desnatado molico (Nestlé®, Brasil)  
Leupeptina (Sigma®, EUA)  
Ocitocina (União química®, Brasil)

Ração comercial (Nuvilab®, Brasil)  
Streptavidina (Zymed®, EUA)  
Sulfato de cobre (Synth®, Brasil)  
Sulfato de magnésio (Merck®, Alemanha)  
Tartarato de sódio e potássio (Merk®, Alemanha)  
Tiopental sódico (Cristália®, Brasil)  
TritonX-100 (Vetec®, Brasil)

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE REAGENTES .....	XI
RESUMO .....	XV
ABSTRACT .....	XVI
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Programação metabólica e doenças da sociedade atual.....	2
1.2 Processo de estímulo-secreção e ação insulínica.....	4
1.3 Modelo de hiperalimentação por redução de ninhada .....	9
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral .....	12
2.2 Objetivos específicos .....	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Modelo de hiperalimentação por redução de ninhada .....	14
3.2 Estimativa do consumo de leite materno .....	15
3.3 Coleta de leite de ratas Wistar .....	15
3.4 Macronutrientes do leite de ratas Wistar .....	15
3.5 Consumo alimentar na fase adulta.....	17
3.6 Crescimento naso-anal.....	17
3.7 Ganho de peso corporal .....	17
3.8 Índice de Lee.....	17
3.9 Peso da gordura retroperitoneal .....	18
3.10 Proteínas da carcaça.....	18
3.11 Triglicerídios do plasma .....	19
3.12 Colesterol total do plasma .....	19
3.13 Colesterol HDL do plasma .....	20
3.14 Colesterol VLDL e LDL do plasma .....	21
3.15 Glicemia.....	21
3.16 Insulinemia .....	22
3.17 Razão entre insulinemia e glicemia .....	22

3.18	Teste de tolerância à glicose .....	22
3.19	Isolamento das ilhotas pancreáticas .....	22
3.20	Perfusão das ilhotas pancreáticas .....	23
3.21	Secreção de insulina in vitro .....	24
3.22	Conteúdo de GLUT2 e de AKT .....	24
3.23	Análise estatística .....	25
4	RESULTADOS .....	27
4.1	Consumo e macronutrientes do leite materno .....	27
4.2	Crescimento naso-anal .....	28
4.3	Ganho de peso corporal .....	29
4.4	Consumo alimentar na fase adulta .....	30
4.5	Índice de Lee, gordura retroperitoneal e proteínas da carcaça .....	31
4.6	Glicemia, insulinemia e lipidograma .....	32
4.7	Insulinemia/glicemia e teste de tolerância à glicose .....	33
4.8	Secreção de insulina in vitro .....	34
4.9	Conteúdo de GLUT2 e de AKT .....	35
5	DISCUSSÃO .....	37
6	CONCLUSÃO .....	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

## RESUMO

O excesso de nutrientes em períodos críticos do desenvolvimento age como um estímulo gerando respostas adaptativas que podem modificar o organismo de forma permanente de modo a propiciar o aparecimento de doenças crônicas na idade adulta (Impressão e Programação metabólica). Sabendo-se que ratos criados em ninhadas reduzidas têm sido utilizados como modelo experimental para o estudo dos efeitos prospectivos da hiperalimentação na lactação, este trabalho teve com objetivo geral estudar a influência da hiperalimentação sobre o processo de estímulo-secreção de insulina *in vitro* em ratos Wistar adultos criados em ninhadas reduzidas. Para induzir a hiperalimentação as ninhadas foram reduzidas (NR) a 4 filhotes machos por lactante no 3<sup>o</sup> dia de vida pós-natal. As ninhadas controles (NC) foram ajustadas em 10 filhotes por lactante. Observamos que os filhotes das ninhadas apresentaram um maior consumo de leite aos 10 dias ( $x = 2,66\text{g}/24\text{h} \pm 0,05$ ;  $p = 0,004$ ) e 21 dias ( $x = 7,10\text{g}/24\text{h} \pm 0,05$ ;  $p = 0,001$ ) em comparação aos filhotes controles ( $x = 2,01\text{g}/24\text{h} \pm 0,10$  e  $x = 5,22\text{g}/24\text{h} \pm 0,28$ ). Verificamos que as NR apresentaram um aumento de 52% do peso corporal aos 21 dias de idade em comparação as NC. Na idade adulta identificamos que as NR exibiram um aumento de 25% no peso corporal, aumento da área da curva representativa do consumo alimentar ( $x = 144,20 \pm 3,07$  e  $x = 113,10 \pm 3,26$ ;  $p = 0,007$ ), maior Índice de Lee ( $x = 315,10\text{g}/\text{mm} \pm 5,85$  e  $x = 282,50 \text{g}/\text{mm} \pm 4,60$ ;  $p = 0,002$ ), elevação do conteúdo de gordura retroperitoneal ( $x = 5,90\text{g} \pm 0,34$  e  $x = 2,40\text{g} \pm 0,18$ ;  $p = 0,0002$ ) e aumento da insulinemia de jejum ( $x = 58,54\mu\text{UI}/\text{ml} \pm 6,70$  e  $x = 31,00 \mu\text{UI}/\text{ml} \pm 3,97$ ;  $p = 0,01$ ). Além disso, verificamos que as NR apresentaram uma maior área da curva representativa da secreção de insulina *in vitro* durante 20 minutos de estimulação com solução de glicose à 16,7 mM ( $x = 2723 \pm 148,50$  e  $x = 2080 \pm 102,80$ ;  $p = 0,01$ ) e maior conteúdo de GLUT2 ( $x = 45562,00\text{U.A.} \pm 9312,00$  e  $x = 19957,00\text{U.A.} \pm 2895,00$ ;  $p = 0,02$ ) e de AKT ( $x = 51163,00\text{U.A.} \pm 3837,00$  e  $x = 26922,00\text{U.A.} \pm 2796,00$ ;  $p = 0,002$ ) em ilhotas pancreáticas em comparação as NC. Através destes resultados concluímos que a hiperalimentação na lactação pode programar permanentes alterações nas células  $\beta$  pancreáticas na fase tardia do desenvolvimento.

## ABSTRACT

Overnutrition during critical developmental periods is suggested to be a risk factor to the metabolic disorders later in life (Metabolic Imprinting and Programming). Rats raised in small litters have been shown to be an appropriated experimental model to study the consequences of overnutrition during a critical perinatal period. To induce early postnatal overnutrition, the litter size was reduced to 4 pups per litter at the 3<sup>rd</sup> day after birth (SL). In the control group (NL), the litter size was adjusted to 10 pups per litter. We found that the SL ingested more milk at 10 days ( $x= 2,66 \text{ g/24h} \pm 0,05$ ;  $p= 0,01$ ) and 21 days of age ( $x= 7,10 \text{ g/24h} \pm 0,05$ ;  $p= 0,01$ ) compared with NL ( $x= 2,01 \text{ g/24h} \pm 0,10$  e  $x= 5,22 \text{ g/24h} \pm 0,28$ ). We observed that SL had an increase in body weight of 52% at 21 days and 25% at 1 year compared with NL. In adulthood, the SL had increased in the area under the curve correspondent to the food intake ( $x= 144,20 \pm 3,07$  e  $x= 113,10 \pm 3,26$ ;  $p= 0,01$ ), high body fat ( $x= 5,90\text{g} \pm 0,34$  e  $x= 2,40\text{g} \pm 0,18$ ;  $p= 0,01$ ) and an elevated fasting plasma insulin ( $x= 58,54 \mu\text{UI/ml} \pm 6,70$  e  $x= 31,00 \mu\text{UI/ml} \pm 3,97$ ;  $p= 0,01$ ). In addition, the SL exhibited increased in the area under the curve correspondent to insulin secretion *in vitro* during a 20 minute stimulation with 16.7 mM glucose solution ( $x= 2723 \pm 148,5$  e  $x= 2080 \pm 102,80$ ;  $p= 0,04$ ), accompanied by elevated content of GLUT2 ( $x= 45562,00\text{A.U.} \pm 9312,00$  e  $x= 19957,00\text{A.U.} \pm 2895,00$ ;  $p= 0,02$ ) and AKT ( $x= 51163,00\text{A.U.} \pm 3837,00$  e  $x= 26922,00\text{A.U.} \pm 2796,00$ ;  $p= 0,01$ ) in pancreatic islets compared with NL. These findings indicate that early postnatal overnutrition during a critical developmental period of life may program permanent alterations in the pancreatic  $\beta$  cell later in life.

*Introdução*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Programação Metabólica e doenças da sociedade atual

A Organização Mundial da Saúde reconheceu a obesidade como uma epidemia global. Foi constatado que, em termos mundiais, pelo menos 1 bilhão de adultos apresenta sobrepeso e 300 milhões são obesos. Considerada inicialmente uma doença restrita a países economicamente desenvolvidos, a obesidade que por definição significa excesso de gordura corporal, emergiu como uma das maiores preocupações na área de saúde em quase todos os países do mundo.

As taxas de prevalência da obesidade cresceram consideravelmente na Europa, em países da Ásia (Popkin, 2001; 2002), no Norte e Sul da África, e também na América Latina (Puoane, Steyn *et al.*, 2002). Nos Estados Unidos da América, a prevalência de obesidade aumentou nos últimos 25 anos e atualmente 65% desta população são classificados como obesos ou população de sobrepeso (Flegal, Carroll *et al.*, 2002). No Brasil, estudos baseados na comparação entre inquéritos de base populacional mostraram que em 15 anos (1975 a 1989) a prevalência de sobrepeso aumentou 53% entre adultos com mais de 18 anos de idade (Sichieri, Coitinho *et al.*, 1994). Além disso, a pesquisa de Orçamentos Familiares constatou que a população brasileira feminina e masculina adulta apresentou respectivamente 40% e 41,1% de excesso de peso e 13,1% e 8,9% de obesidade (Ibge, 2002-2003).

Acompanhando o aumento da obesidade, houve também aumento da prevalência de diabetes mellitus – doença caracterizada por hiperglicemia crônica e captação prejudicada da glicose. Estima-se que 80 milhões de pessoas na faixa etária de 45 a 64 anos em países desenvolvidos e em desenvolvimento sejam diabéticas (Wild, Roglic *et al.*, 2004). No Brasil, um estudo conduzido em 1988 em nove capitais de estados brasileiros, demonstrou que a prevalência de diabetes mellitus e da tolerância prejudicada à glicose na população urbana (30 a 69 anos de idade) é de 7,6% e 7,8%, respectivamente (Sartorelli, 2003).

A Síndrome metabólica, caracterizada por um agrupamento de alterações metabólicas, tais como hipertensão arterial, hipertrigliceridemia, diminuição das lipoproteínas de alta densidade e aumento da circunferência a cintura (Mota, 2006; Ramos, 2006), possui uma ligação clara com a obesidade. Esta relação é evidenciada pelas taxas de prevalência da

Síndrome metabólica de 4,6 % em indivíduos eutróficos, 22,4% em indivíduos com sobrepeso e 59,6% em indivíduos obesos dos Estados Unidos da América (Park, Zhu *et al.*, 2003).

No Brasil a carência de dados sobre a ocorrência da Síndrome metabólica motivou a investigação epidemiológica desta doença no distrito rural de Cavunge (Bahia), onde identificou-se uma prevalência de 30% para a Síndrome metabólica, através de uma amostra aleatória constituída por 240 indivíduos. Após estratificação da amostra por sexo e idade, identificou-se uma prevalência de 56,9% entre mulheres com idade maior ou igual a 45 anos (Oliveira, 2006).

A obesidade e doenças associadas são comumente atribuídas ao estilo de vida sedentário e ao excessivo consumo de quilocalorias. Entretanto, como será discutido a seguir, o estilo de vida sedentário e o excessivo consumo de calorias não iniciam e sim aceleram o estabelecimento da obesidade e de outras patologias.

Um clássico estudo relacionando a nutrição inadequada com conseqüências a longo prazo demonstrou um aumento da incidência de obesidade em homens de 19 anos de idade, cujas mães sofreram restrição alimentar no início da gravidez durante a “fome holandesa”, no período de 1944 a 1945 (Ravelli, Stein *et al.*, 1976). Além da obesidade, a desnutrição materna também foi relacionada ao aumento do risco para diabetes melittus tipo 2, hipertensão e doenças cardiovasculares (Godfrey e Barker, 2000).

Na década de 90 pesquisadores utilizaram os termos Impressão e Programação Metabólica para descrever fenômenos biológicos relacionados ao consumo de nutrientes. A privação e o excesso de nutrientes atuam como mecanismos de Impressão Metabólica, ou seja, marcam o organismo, se ocorrerem com a intensidade adequada e em períodos críticos do desenvolvimento. Muitos períodos críticos ou específicos do desenvolvimento são conhecidos e alguns deles são: a fertilização, ovulação, gestação, lactação e puberdade. A ocorrência do fenômeno de Impressão Metabólica durante a gestação ou lactação levaria ao aparecimento de alterações cardiovasculares, metabólicas e neuroendócrinas no início da vida e a permanência destas na vida adulta, que por sua vez caracterizariam o processo de Programação Metabólica. Todavia as respostas adaptativas envolvidas nos fenômenos Impressão e Programação Metabólica estariam relacionadas ao aparecimento de patologias na fase tardia do desenvolvimento (Waterland e Garza, 1999).

A ligação do desenvolvimento da adiposidade na idade adulta com a privação nutricional no início da vida também pôde ser encontrada aqui no Rio de Janeiro. Um estudo feito com aproximadamente 1963 indivíduos adultos identificou que as maiores prevalências de sobrepeso e obesidade foram associadas a homens e mulheres de baixa estatura, e o

aparecimento destas alterações não foi atribuído às condições sócio-econômicas ou ao consumo de alimentos na idade adulta. Sabendo-se que a estatura é um importante indicador do estado nutricional a longo prazo e que pode ser afetada pela desnutrição, principalmente durante os primeiros 2 anos de vida (Siervogel, Roche *et al.*, 1991), este estudo evidenciou que o aparecimento do sobrepeso e da obesidade possivelmente está associado ao fenômeno de Programação Metabólica gerado pela privação de alimentos (Sichieri, Siqueira *et al.*, 2000). A baixa estatura também pode estar associada com a redução do gasto energético, maior suscetibilidade aos efeitos de dietas hiperlipídicas, menor oxidação de gorduras e inadequada regulação da ingestão alimentar na idade adulta (Sawaya e Roberts, 2003).

É fundamental uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à nutrição e à Programação Metabólica para que se determine estratégias para prevenção de doenças, promoção da saúde, qualidade de vida e longevidade. Dentre todos os aspectos envolvidos neste fenômeno, este trabalho se propôs a investigar a influência da hiperalimentação na lactação sobre o processo de estímulo-secreção de insulina *in vitro* em presença de glicose em ratos Wistar machos adultos criados em ninhada reduzida.

## **1.2 Processo de estímulo-secreção e ação insulínica**

Pesquisas têm sido dedicadas ao entendimento dos mecanismos moleculares deste hormônio polipeptídico anabólico e suas relações com distúrbios, tais como sobrepeso, obesidade, diabetes mellitus e outras doenças relacionadas.

A insulina é uma molécula formada por duas cadeias polipeptídicas (A e B) ligadas por duas pontes dissulfeto e é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso das células  $\beta$  pancreáticas, a partir da pré-pró-insulina que, ao direcionar-se ao complexo de Golgi é convertida em pró-insulina. A partir da atuação de enzimas ocorre a clivagem da pró-insulina em insulina e peptídeo C. A insulina é armazenada em grânulos, enquanto o peptídeo C sofre degradação hepática. A secreção de insulina é influenciada por substratos energéticos metabolizáveis pelas células  $\beta$  pancreáticas, sendo a glicose o secretagogo mais importante na idade adulta (Wicksteed, Alarcon *et al.*, 2003).

A entrada de glicose nas células  $\beta$  pancreáticas ocorre através do processo de difusão facilitada, com a participação de uma proteína integral de membrana, denominada GLUT2 – Transportador de glicose tipo 2 (Heimberg, De Vos *et al.*, 1995). Esta proteína, apresenta 524

aminoácidos e aproximadamente 55-kDa, possui um  $V_{max}$  e um  $K_m$  elevados (aproximadamente 17 mmol/ L) permitindo que o transporte de glicose aumente rapidamente quando a glicemia se eleva. Após entrar nas células  $\beta$ , a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato (G-6-P) por duas enzimas: a hexoquinase IV (glicoquinase) que possui um  $V_{max}$  baixo e  $K_m$  elevado (entre 8 a 16 mmol/ L) e a hexoquinase I que possui um baixo  $K_m$  (< 0,1 mmol/ L). Entretanto, a enzima hexoquinase I é fortemente inibida pela G-6-P e, em menor grau, pela frutose-1-6-bifosfato, o que transfere para a glicoquinase o papel preponderante na fosforilação da glicose nas células  $\beta$ . Sugere-se que o GLUT2 e a glicoquinase se associam fisiologicamente formando um complexo que atua no controle da entrada e do metabolismo da glicose nas células  $\beta$  pancreáticas (Tal, Liang *et al.*, 1992).

O destino preferencial da G-6-P nas células  $\beta$  é a glicólise (Boschero, 1996). O piruvato formado no citoplasma é transportado à mitocôndria, onde é convertido a acetil-CoA pela piruvato desidrogenase. Subsequentemente, a acetil-CoA entra no ciclo de Krebs levando a um aumento de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH<sub>2</sub>).

O metabolismo da glicose gera ATP e a fração ATP/ADP aumenta no citoplasma (Deeney, Prentki *et al.*, 2000). Essa relação ATP/ADP aumentada provoca o fechamento dos canais de potássio ATP dependentes e a consequente despolarização da membrana celular levando a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. O aumento do influxo de cálcio para as células  $\beta$  resulta em despolarização da membrana plasmática e a exocitose da insulina (Ashcroft, 2000), vide figura 1.

Uma vez secretada, a insulina inicia sua ação ao se ligar ao seu receptor específico que está presente na membrana plasmática das próprias células  $\beta$  pancreáticas e em diversas outras células do organismo em concentrações que variam de 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 nas células adiposas e hepáticas (Haber, 2001).

O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$  unidas por ligações dissulfeto. A subunidade  $\alpha$  é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade  $\beta$  é uma proteína transmembrana responsável pela transmissão do sinal e possui atividade tirosina quinase. O ATP age como doador de fosfatos e a fosforilação ocorre em resíduos de tirosina. A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  permite que a subunidade  $\beta$  adquira atividade quinase, levando à alteração conformacional e a autofosforilação do receptor nas subunidades  $\beta$  em múltiplos resíduos de tirosina (1158, 1162, 1163). Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos, tais como as proteínas IRS – substrato do receptor de

insulina (Ebina, Ellis *et al.*, 1985; White, Shoelson *et al.*, 1988; Patti e Kahn, 1998; Pessin e Saltiel, 2000). A fosforilação destes substratos provoca a ativação de uma diversidade de outras proteínas, tais como a AKT (também chamada de PKB – proteína quinase B), que atuam de modo coordenado controlando a glicemia, a síntese e o armazenamento de carboidratos, lipídios e proteínas, o processo de replicação das células  $\beta$  pancreáticas e o consumo de alimentos.

Uma vez fosforiladas, as proteínas IRS1 e IRS2 se ligam a subunidade regulatória (p85) da molécula PI3-K (fosfoinositídeo 3-quinase), que promove a ativação da subunidade p110. A subunidade p110 catalisa a fosforilação de fosfoinositídeos de inositol, produzindo fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, que regula a proteína quinase dependente de fosfoinositídeo (PDK-1), uma serina/ treonina quinase que fosforila e ativa a enzima AKT. Quando ativada, a AKT participa do processo de translocação de transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) do citossol para a membrana plasmática no tecido adiposo, muscular esquelético e cardíaco para promover aumento da captação de glicose do sangue e controle da glicemia. Além disso, através da AKT, a insulina controla a síntese do glicogênio no fígado e no músculo esquelético, inativando a glicogênio-sintase kinase 3 (GSK3) e ativando a glicogênio sintetase (Zecchin, 2004).

A insulina estimula a síntese de lipídios e inibe sua degradação. Em adipócitos, a glicose é primariamente armazenada como lipídio devido à ativação de enzimas incluindo a acetil-CoA carboxilase (ACC), que converte a acetil-CoA em malonil-CoA, e a ácido graxo sintase (FAS), que converte a malonil-CoA em palmitato. O bloqueio da lipólise em adipócitos é possível devido à inibição da enzima lipase hormônio sensível (LPL). A LPL é ativada pela PKA (proteína quinase A) que por sua vez é inibida pela insulina (Saltiel e Kahn, 2001). A insulina também regula a síntese de lipídios através dos fatores de transcrição SREBP (*Sterol regulatory element-binding proteins*). No fígado, o SREBP-1c aumenta preferencialmente a transcrição de genes envolvidos na síntese das enzimas ACC e FAS. Em períodos de excesso de carboidratos, a insulina estimula a síntese de ácidos graxos no fígado. Na situação de excesso de adiposidade a insulina interfere na quantidade de ácidos graxos livres (AGL) plasmáticos liberados do tecido adiposo promovendo a gliconeogênese no fígado.

A insulina ainda atua no crescimento muscular esquelético através da enzima *mammalian target of rapamycin* (mTOR). A partir da ligação da insulina ao seu receptor há ativação da PI3K que por sua vez ativa o complexo mTOR rictor que fosforila a AKT em resíduos de serina 473. Estando ativada, a AKT inibe fatores de transcrição chamados de

FOXO e ativa o complexo mTOR raptor. A inibição destes fatores de transcrição leva à inibição das ubiquitinas ligases Atrogin1 e MuRF1, o que conduz ao bloqueio do processo de degradação protéica. Por outro lado, com a ativação do complexo mTOR raptor ocorre a fosforilação da proteína p70-ribossomal S6 quinase (p70<sup>rsk</sup>), que promove o crescimento através da indução de processos miogênicos de diferenciação celular e do aumento do volume citoplasmático dos mioblastos (Saltiel e Kahn, 2001; Glass, 2005; Pende, 2006).

As vias de sinalização da insulina envolvidas na translocação de transportadores de glicose, síntese de carboidratos e síntese de lipídios podem ser visualizadas na figura 2. Nesta ilustração também está presente a proteína tirosina-fosfatase 1B (PTP1B) que é responsável pela desfosforilação do receptor de insulina e de seus substratos.

Equilibrando sua ação anabólica em tecidos periféricos, a insulina atua no hipotálamo inibindo a fome e o consumo de alimentos.

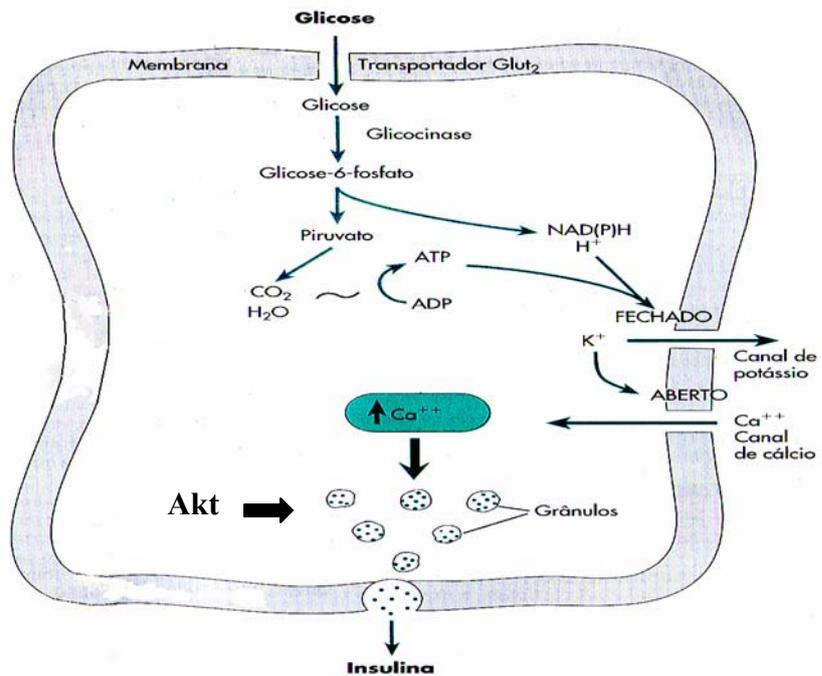
No núcleo arqueado do hipotálamo existe um grupo de neurônios de primeira ordem que possuem receptores para insulina e enviam suas projeções para áreas cerebrais relacionadas ao consumo de alimentos e ao gasto energético. Estes neurônios são o neuropeptídeo Y (NPY), o peptídeo agouti-relacionado (AgRP) e a pro-opiomelanocortina (POMC). A POMC possui efeitos opostos aos do NPY e da AgRP. Enquanto a POMC exerce ação anorexigênica ao inibir o consumo de alimentos, o NPY e a AgRP atuam como neurônios orexigênicos estimulando o consumo de alimentos e o armazenamento de energia. A insulina inibe o NPY e o AgRP e estimula a POMC (Figura 3), ou seja, ocorre a inibição do consumo de alimentos e do armazenamento de energia (Niswender, Baskin *et al.*, 2004).

Havendo resistência periférica à insulina (incapacidade das células de tecidos periféricos em responder à ação da insulina), podem ocorrer alterações imediatas no metabolismo, tais como: diminuição da captação de glicose, principalmente nos tecidos muscular esquelético e adiposo, diminuição da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, aumento da produção hepática de glicose (via aumento da gliconeogênese e glicogenólise) e hiperglicemia. Em consequência, pode haver um aumento da secreção de insulina como um mecanismo compensatório para normalização da glicemia. Entretanto, este aumento na secreção de insulina geralmente não se mantém e a hiperglicemia volta a existir levando, a longo prazo, à diminuição da capacidade de secreção de insulina em resposta à glicose, agravando a resistência à insulina (Kaneto, Nakatani *et al.*, 2004) e gerando o aparecimento de DM2 e outras doenças relacionadas (Gungor, Bacha *et al.*, 2005).

A caracterização do perfil de secreção de insulina e sua relação com proteínas envolvidas no processo de estímulo-secreção deste hormônio, tais como o GLUT2 e AKT são

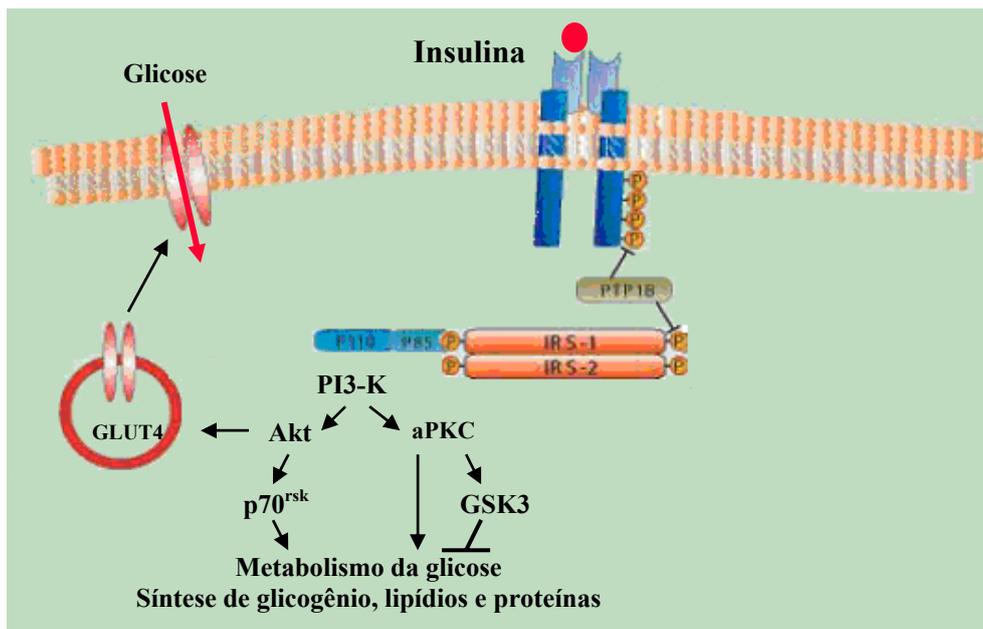
de fundamental importância para o entendimento da patogênese das doenças relacionadas com as alterações do metabolismo da glicose.

**Figura.1: Processo de estímulo-secreção de insulina pela célula  $\beta$  pancreática**



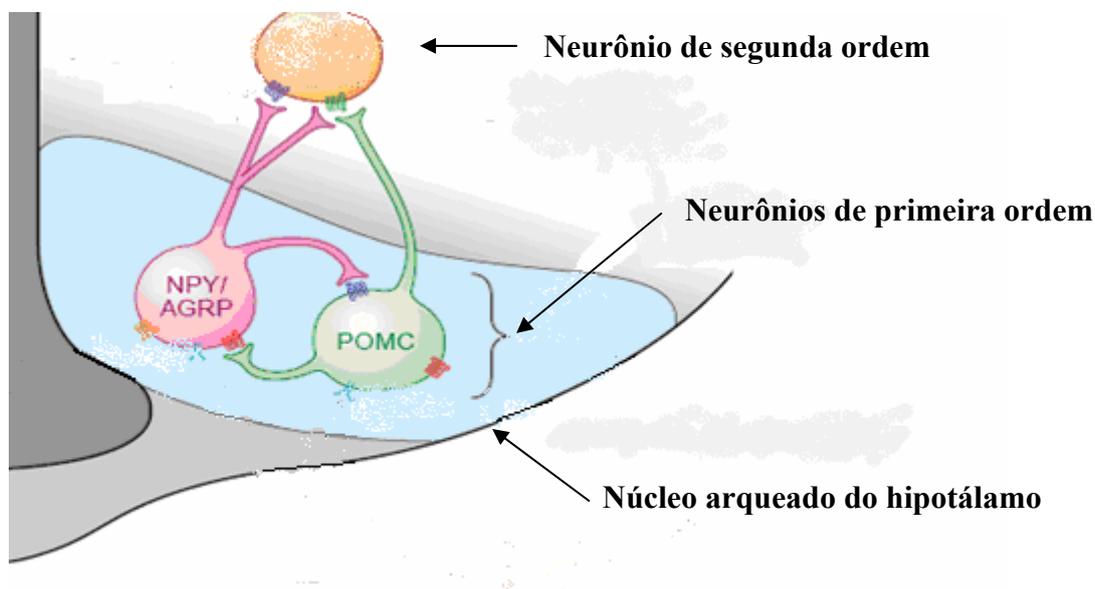
Adaptado de Berne, 2004

**Figura 2: Vias de sinalização da insulina relacionadas ao metabolismo energético**



Adaptado de Zecchin 2004

**Figura 3: Ação da insulina nos neurônios hipotalâmicos relacionados ao consumo de alimentos**



Adaptado de Niswender, Baskin *et al.*, 2004

### **1.3 Modelo de hiperalimentação por redução de ninhada**

Durante a gestação, as ilhotas pancreáticas de ratos Wistar têm um rápido crescimento devido aos processos de replicação e maturação de células precursoras encontradas nos ductos pancreáticos (Hill e Hogg, 1991; Kaung, 1994). Após o nascimento, a taxa de crescimento das ilhotas pancreáticas declina em torno de 3 a 4 dias, mas continua a acontecer um remodelamento das mesmas durante 2 a 3 semanas de vida (Finegood, Scaglia *et al.*, 1995; Scaglia, Smith *et al.*, 1995). Neste período, os processos de neogênese e de apoptose preparam as ilhotas pancreáticas para o metabolismo pós-natal, de modo que as ilhotas responsivas a aminoácidos são substituídas por ilhotas que apresentam secreção aguda de insulina em presença de glicose (Hill e Duvillie, 2000). Tais eventos fisiológicos confirmam que a nutrição adequada na gestação ou logo após o nascimento é fundamental, pois estes períodos são especialmente vulneráveis aos efeitos da Impressão metabólica.

As conseqüências da privação ou do consumo excessivo de nutrientes na gestação ou na lactação são evidentes. Foi demonstrado que a desnutrição materna de roedores durante a gestação causa mudanças na estrutura e função de vários órgãos da prole. A baixa ingestão de

proteínas por ratas prenhes produz alterações nas ilhotas pancreáticas da prole, tais como redução na vascularização, comprometimento da capacidade proliferativa e alteração da sensibilidade à insulina nos músculos esqueléticos (Berney, Desai *et al.*, 1997; Latorraca, Reis *et al.*, 1998). Além disso, ocorre redução da vascularização do córtex cerebral e prejuízo do desenvolvimento hipotalâmico (Bennis-Taleb, Remacle *et al.*, 1999). Por outro lado, a hipernutrição na lactação através do modelo de redução de ninhada produz hiperfagia, sobrepeso, aumento de gordura corporal e hiperinsulinemia no período de lactação. Na idade adulta, o sobrepeso persiste e continua a ser acompanhado por várias alterações comuns à Síndrome Metabólica, tais como: resistência periférica à insulina, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e aumento da pressão sistólica (Plagemann, Heidrich *et al.*, 1992; Plagemann, Harder *et al.*, 1999).

Ratos criados em ninhadas reduzidas têm sido considerados como modelo de estudo apropriado para investigações das conseqüências do consumo excessivo de nutrientes a curto e a longo-prazo. Dentre os modelos de hiperalimentação existentes, o modelo por redução de ninhada também se destaca pela vantagem econômica, pois para sua implementação não é necessário realizar investimento financeiro em aparelhos para aleitamento artificial como ocorre no modelo “*pup in a cup*”, que consiste em administrar leite artificial rico em carboidratos através de cânula via intragástrica em filhotes de ratos Wistar no 4º dia de vida até o final do período de lactação (Srinivasan, Laychock *et al.*, 2003). Além disso, o modelo de ninhada reduzida permite a observação do comportamento alimentar individual ou coletivo em diferentes fases da vida.

## *Objetivos*

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar a influência da hiperalimentação na lactação sobre o processo de estímulo-secreção de insulina *in vitro* em presença de glicose em ratos Wistar adultos.

### 2.2 Objetivos específicos propostos para os animais criados em ninhada reduzida e seus respectivos controles

- ✓ Estimar a produção e identificar os macronutrientes encontrados no leite de ratas Wistar aos 10 e 21 dias do período de lactação.
- ✓ Analisar o crescimento naso-anal e o ganho de peso corporal de ratos Wistar a partir do nascimento até a idade de 1 ano.
- ✓ Avaliar o consumo alimentar de ratos Wistar na idade de 1 ano.
- ✓ Conferir a relação do peso corporal com a distância naso-anal de ratos Wistar aos 365 dias de vida através do Índice de Lee.
- ✓ Quantificar a gordura retroperitoneal e o conteúdo de proteínas da carcaça de ratos Wistar aos 365 dias de vida.
- ✓ Medir a glicemia e a insulinemia de jejum bem como os lipídios do plasma de Ratos Wistar aos 365 dias de vida.
- ✓ Avaliar a presença de resistência à insulina através da relação insulinemia/ glicemia e do teste de tolerância à glicose em ratos Wistar adultos.
- ✓ Verificar a secreção de insulina *in vitro* em presença de solução de glicose nas concentrações 2,8 mM e 16,7 mM em ratos Wistar adultos.
- ✓ Investigar o conteúdo de GLUT2 e de AKT das ilhotas pancreáticas perfundidas com solução de glicose a 2,8 mM pela técnica de *Western Blotting* em ratos Wistar adultos.

## *Materiais e Métodos*

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Modelo de hiperalimentação por redução de ninhada

Fêmeas Wistar com 3 meses de idade criadas no biotério do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e do Desenvolvimento pertencente ao Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), foram mantidas a temperatura média de 23<sup>o</sup>C e ciclo de luminosidade de 12 horas (claro e escuro). Com a determinação do ciclo estral e acasalamento, as fêmeas foram separadas dos machos e colocadas em gaiolas individuais, onde receberam ração comercial e água *ad libitum* durante todo o período de gestação.

Ao nascimento dos filhotes, foram formadas ninhadas de 10 filhotes por lactante. No 3<sup>o</sup> dia de vida, as ninhadas foram reduzidas a 4 filhotes machos por lactante para indução da hiperalimentação e permaneceram assim até o final da lactação. Outras ninhadas foram preservadas com 10 filhotes por lactante desde o nascimento até os 21 dias de vida (final da lactação) para servirem de controle das ninhadas reduzidas (Plagemann, Harder *et al.*, 1999).

Aos 21 dias de idade os filhotes foram separados das lactantes e alocados em gaiolas coletivas para ninhada reduzida e para ninhada controle, tendo sido agrupados no máximo 5 animais por gaiola. Aos 10 e 21 dias de lactação foi estimada a produção e a composição dos macronutrientes do leite de ratas Wistar. Após o desmame os animais receberam ração comercial e água *ad libitum* até o momento da realização dos experimentos.

O crescimento naso-anal e o ganho de peso corporal foram acompanhados desde o nascimento até os animais completarem 1 ano de vida. Nesta data também foram analisados o consumo alimentar, a gordura retroperitoneal, as proteínas da carcaça, os lipídios do plasma, a glicemia, a insulinemia, a secreção de insulina *in vitro* em presença de glicose e a expressão de GLUT2 e de AKT nas ilhotas pancreáticas.

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais aprovados pela Comissão de Ética em pesquisa desta universidade.

### 3.2 Estimativa do consumo de leite materno

O volume de leite materno consumido em 24 horas pelos filhotes das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle aos 10 e 21 dias de lactação foi estimado através da fórmula descrita abaixo (Russell, 1980).

$$L = Pa2 - Pa1 \cdot (1-K)$$

**L:** Volume de leite produzido (g)

**Pa2:** Peso dos filhotes amamentados no final das 24 horas

**Pa1:** Peso dos filhotes amamentados no início das 24 horas

**K:** Perda relativa de peso (média) dos filhotes jejuados, onde  $K = (Pj1 - Pj2) / Pj1$

**Pj1:** Peso dos filhotes em jejum no início das 24 horas

**Pj2:** Peso dos filhotes em jejum no final das 24 horas

### 3.3 Coleta de leite de ratas Wistar

As amostras de leite materno foram obtidas das lactantes das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle no 10<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia de lactação. As lactantes foram separadas de seus filhotes por 2 horas. Em seguida foi injetado 1 ml de ocitocina via subcutânea para induzir a ejeção de leite (Pine, Jessop *et al.*, 1994). Trinta minutos após, as lactantes foram anestesiadas com tiopental e então foi feita a ordenha manual das glândulas mamárias. Foram coletados aproximadamente 500 µl de leite por lactante que posteriormente foram congelados a -20<sup>o</sup> C até a análise.

### 3.4 Macronutrientes do leite de ratas Wistar

A lactose do leite de ratas Wistar foi determinada através do método colorimétrico utilizando o ácido pícrico (Erb, Sitarz *et al.*, 1977). Em 50 µl de leite de ratas Wistar foram

adicionados 200 µl de água destilada. Após agitação em vortex, foram adicionados 4,75 ml de ácido pícrico saturado. Em seguida foi feita centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos. Um ml de cada sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio e após adição de 500 µl de carbonato de sódio a 25% e agitação em vortex os tubos foram aquecidos a 100<sup>o</sup> C por 20 minutos. Posteriormente os tubos foram resfriados e acrescidos de 8,5 ml de água destilada. Foi construída uma curva padrão a partir de uma solução mãe de lactose (60 mg/ml). A leitura em duplicata da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 520 nm e os resultados foram expressos em mg/dl.

Para determinar a proteína total do leite de ratas Wistar (Peterson, 1977), as amostras de leite (10 µl) foram diluídas com água destilada até o volume total de 1 ml. Em 100 µl de leite diluído (contendo 100 µg de proteína) foram adicionados 100 µl de deoxicolato de sódio 0,15% e 100 µl de ácido tricloroacético 72%. Esta solução foi agitada em vortex e após repouso de 10 minutos foi centrifugada a 3000 rpm por 40 minutos. O sobrenadante foi desprezado invertendo-se os tubos de ensaio sobre papel absorvente. O precipitado obtido foi diluído em uma ml de água destilada e a seguir foi adicionado 1ml do reativo A que foi composto por uma parte de CTC {carbonato de sódio a 10%, tartarato de sódio e potássio a 0,2% e sulfato de cobre a 0,1%}, uma parte de dodecil sulfato de sódio a 10%, uma parte de hidróxido de sódio a 3,2% e uma parte de água destilada. Após agitação em vortex e repouso de 10 minutos, foi adicionado 0,5 ml do reativo B {1 parte de *folin-ciocalteus phenol* diluída em 5 partes de água destilada}. Após nova agitação em vortex e repouso de 30 minutos foi realizada a leitura em duplicata da absorbância em espectrofotômetro a 750 nm. Duas alíquotas de solução de albumina soro bovina equivalentes a 10 µg e 100 µg foram utilizadas como padrão. Os resultados foram expressos em mg/dl.

Os triglicerídeos do leite de ratas Wistar foram determinados através do método colorimétrico utilizando-se “kit” comercial Triglicérides-PP (Analisa®, Brasil) de determinação de triglicerídeos totais no soro. A leitura da absorbância em duplicata foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados foram expressos em mg/dl.

### 3.5 Consumo alimentar na fase adulta

Foi verificado o consumo alimentar individual de ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle na idade de 1 ano, através de pesagem em balança de precisão modelo BD-600 (Instrutherm®, Brasil).

### 3.6 Crescimento naso-anal

Ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle tiveram seu comprimento naso-anal verificados através da utilização de fita métrica (C&C®, Brasil) no 1<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia de vida. Ao completar 1 mês de idade estes animais passaram a ter seu comprimento verificado mensalmente até aos 12 meses.

### 3.7 Ganho de peso corporal

Ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle foram submetidos à pesagem em balança de precisão no 1<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia de vida. Ao completar 1 mês de idade estes animais passaram a ser pesados mensalmente até aos 12 meses.

### 3.8 Índice de Lee

O Índice de Lee (IL) foi calculado através da fórmula descrita a seguir (Bernardis, 1968).

$$\mathbf{IL} = \frac{\sqrt[3]{\text{Peso corporal (g)}}}{\text{Distância naso-anal (mm)}} \times 10^4$$

### **3.9 Peso da gordura retroperitoneal**

Ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle com 1 ano de idade, tiveram a gordura da região retroperitoneal retirada e pesada em balança de precisão.

### **3.10 Proteínas da carcaça**

Para quantificar as proteínas da carcaça de ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle (Leshner, Litwin *et al.*, 1972), após sacrifício, todas as vísceras foram retiradas e em seguida as carcaças foram pesadas em balança de precisão e autoclavadas por 1 hora. Posteriormente foram separadas alíquotas contendo 1 g do homogeneizado que foram aquecidas em banho a 37<sup>0</sup> C por 1 hora em hidróxido de potássio a 0,6 N. Após 15 minutos de agitação em *shaker* horizontal o material foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos. Em seguida foi coletado 200µl do sobrenadante que foi diluído em 10 ml de água destilada. Em 200µl de amostra diluída foi adicionado 1ml do reagente C (50 ml da solução A: 1 ml da solução B). A solução A foi composta por 10 g de carbonato de sódio 2 g de hidróxido de sódio e 1 g de tartarato de sódio e potássio diluídos em 500 ml de água destilada e a solução B foi formada por 0,125 g de sulfato de cobre diluído em 25 ml de água destilada. Após agitação em vortex e repouso de 15 minutos, foi acrescentado 100 µl de reagente *folin-ciocalteus phenol*. Após outra agitação em vortex e repouso de 30 minutos foi realizada a leitura em duplicata da absorbância em espectrofotômetro a 750 nm para determinação das proteínas (Lowry, Rosebrough *et al.*, 1951). Foi construída uma curva padrão a partir de uma solução mãe de albumina soro bovina (2mg/ml). Os resultados foram expressos em gramas de proteína por 100 gramas de carcaça.

### 3.11 Triglicerídios do plasma

Os triglicerídeos totais do plasma de ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controles foram determinados através do método colorimétrico utilizando-se “kit” comercial Triglicérides-PP (Analisa®, Brasil).

Em 10 µl de plasma de ratos Wistar foi adicionado 1 ml do reagente de cor contendo lipase > 100 U/ ml, glicerol quinase > 1,5 U/ ml, glicerol-3P-oxidase > 4 U/ ml e peroxidase > 0,8 U/ L. Após aquecimento em banho a 37<sup>0</sup>C durante 5 minutos foi realizada a leitura em duplicata da absorbância das amostras e do padrão (glicerol equivalente a 200 mg/dl de trioleína) em espectrofotômetro a 500 nm. Os resultados foram expressos em mg/dl e calculados através das fórmulas descritas abaixo.

$$FC = Cp / Ap$$

$$Ca = Fc . Aa$$

**Cp:** Concentração do Padrão

**Ap:** Absorbância do Padrão

**Ca:** Concentração da amostra

**Aa:** Absorbância da amostra

**Fc:** Fator de correção

### 3.12 Colesterol total do plasma

O colesterol total do plasma de ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controles foi determinado através do método colorimétrico utilizando-se “kit” comercial Colesterol-PP (Analisa®, Brasil).

Em 10 µl de plasma de ratos Wistar foi adicionado 1 ml do reagente de cor contendo colesterol estearase > 200 U/ L, colesterol oxidase > 100 U/ L e Peroxidase > 800 U/ L. Após agitação em vortex e aquecimento em banho a 37<sup>0</sup>C durante 5 minutos foi realizada a leitura em duplicata da absorbância das amostras e do padrão (colesterol 200 mg/dl) em espectrofotômetro a 500 nm. Os resultados foram expressos em mg/dl e calculados através das fórmulas descritas a seguir.

$$FC = Cp / Ap$$

$$Ca = Fc . Aa$$

**Cp:** Concentração do Padrão

**Ap:** Absorbância do Padrão

**Ca:** Concentração da amostra

**Aa:** Absorbância da amostra

**Fc:** Fator de correção

### 3.13 Colesterol HDL do plasma

O colesterol HDL do plasma de ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle foi determinado através do método colorimétrico utilizando-se “kit” comercial Colesterol HDL-PP (Analisa®, Brasil).

Em 200 µl de plasma de ratos Wistar foram adicionados 500 µl de precipitante contendo ácido fosfotungstato e cloreto de magnésio para precipitação das VLDL e LDL. Após agitação em vortex e repouso de 10 minutos foi realizada centrifugação a 4000 rpm. Em 100 µl de sobrenadante foram adicionados 1 ml de reagente de cor do “kit” colesterol-PP (Analisa®, Brasil) e após outra agitação em vortex e aquecimento em banho a 37<sup>0</sup>C durante 10 minutos foi realizada a leitura em duplicata da absorbância das amostras e do padrão (colesterol 52,5 mg/dl) em espectrofotômetro a 500 nm. Os resultados foram expressos em mg/dl e calculados através das fórmulas descritas abaixo.

$$FC = Cp / Ap$$

$$Ca = Fc . Aa$$

**Cp:** Concentração do Padrão

**Ap:** Absorbância do Padrão

**Ca:** Concentração da amostra

**Aa:** Absorbância da amostra

**Fc:** Fator de correção

### 3.14 Colesterol VLDL e LDL do plasma

A concentração do colesterol VLDL e LDL do plasma de ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle foi calculada através das equações descritas a seguir.

$$\text{Colesterol VLDL} = \text{Triglicerídeos totais} / 5$$

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

### 3.15 Glicemia

A glicose plasmática de ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle foi determinada através do método colorimétrico utilizando-se “kit” comercial Glicose-PP (Analisa®, Brasil).

Em 10 µl de plasma de ratos Wistar foi adicionado 1 ml do reagente de cor contendo glicoseoxidase 10000 U/ L e peroxidase > 1000 U/ L. Após agitação em vortex e aquecimento em banho a 37<sup>o</sup> C durante 5 minutos foi realizada a leitura em duplicata da absorbância das amostras e do padrão (glicose 100 mg/dl) em espectrofotômetro a 500 nm. Os resultados foram expressos em mg/dl e calculados através das fórmulas descritas abaixo.

$$FC = Cp / Ap$$

$$Ca = Fc . Aa$$

**Cp:** Concentração do Padrão

**Ap:** Absorbância do Padrão

**Ca:** Concentração da amostra

**Aa:** Absorbância da amostra

**Fc:** Fator de correção

### **3.16 Insulinemia**

A insulina do plasma de ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle foi determinada através do método de radioimunoensaio descrito no item 3.21.

### **3.17 Razão entre insulinemia e glicemia**

Para verificar a presença de resistência periférica à insulina foi calculada a razão entre a insulina plasmática e a glicose plasmática (Plagemann, Harder *et al.*, 1999).

### **3.18 Teste de tolerância à glicose**

Um outro indicador de resistência à insulina é o teste de tolerância à glicose. Sendo assim, após jejum de 12 horas, foram administrados (i.p.) 1 g de glicose/Kg de peso corporal dos animais das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle (Burcelin, Crivelli *et al.*, 2002). Amostras de sangue foram coletadas antes da infusão de glicose e 30, 60 e 90 minutos após a infusão. A glicemia foi avaliada através de glucômetro *ACCU CHECK-Active* (Roche®, Alemanha) utilizando-se fitas-teste específicas.

### **3.19 Isolamento das ilhotas pancreáticas**

Os ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle foram anestesiados com tiopental sódico sendo administrados (i.p.) 50 mg/Kg de peso. Em seguida os animais foram laparotomizados para localização do ducto biliar e introdução de um cateter de polivinil (Cole-Parmer®, EUA) para inflar o pâncreas com 20 ml de solução de Hanks para melhor visualização e remoção. A solução de Hanks foi composta por 136 mM de cloreto de sódio; 5 mM de cloreto de potássio; 0,8 mM de sulfato de magnésio; 0,4 mM de fosfato de potássio;

0,2 mM de fosfato de sódio; 1 mM de cloreto de cálcio e 4 mM de bicarbonato de sódio. Após a remoção, o tecido pancreático foi mantido em solução de Hanks acrescida de 2,8 mM de glicose e em presença de mistura carbogênica contendo 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> (Alphagaz®, Brasil) para manutenção do pH em 7,4. O tecido pancreático foi picotado com auxílio de uma tesoura e em seguida foi lavado com solução de Hanks para a retirada dos resíduos de gordura através da eliminação do sobrenadante. Os fragmentos de tecido pancreático foram transferidos para um tubo de ensaio graduado, onde para cada 1 ml de pâncreas fragmentado foram colocadas 4 mg de colagenase (Lacy e Kostianovsky, 1967) diluída em 500 µl de solução de Hanks. Após a aplicação da colagenase os fragmentos de pâncreas foram imediatamente submetidos à mistura carbogênica e banho a 37<sup>0</sup> C durante 6 minutos. Após aeração, o tubo de ensaio foi fechado para ser agitado lentamente durante 3 minutos e vigorosamente durante 1 minuto, ainda em banho a 37<sup>0</sup> C. Em seguida, o homogeneizado contendo as ilhotas pancreáticas isoladas foi lavado com solução de albumina soro bovina 2% e centrifugado a 500 rpm por 30 segundos. O sobrenadante foi desprezado e após outra lavagem com solução de Hanks, o homogeneizado foi observado através de uma lupa (Baush & Lomb®, EUA), possibilitando a coleta e a contagem das ilhotas pancreáticas com o auxílio de uma pipeta *Pauster*.

### **3.20 Perfusão das ilhotas pancreáticas**

Após coletadas, as ilhotas pancreáticas (120 ilhotas/pâncreas) foram acondicionadas em câmara de perfusão swinnex-13 (Millepore®, EUA) com fluxo mantido em 1 ml/minuto por bomba peristáltica (Amersham®, EUA). Foi utilizada solução de Krebs acrescida de glicose a 2,8 mM (Vetec®, Brasil) para realizar a perfusão das ilhotas por 15 minutos. A solução de Krebs foi composta por 120 mM de cloreto de sódio; 5 mM de cloreto de potássio; 25 mM de bicarbonato de sódio; 2,56 mM de cloreto de cálcio e 1,13 mM de cloreto de magnésio. Após o período de 15 minutos, as ilhotas passaram a ser perfundidas com solução de Krebs com glicose a 16,7 mM para estimulação das mesmas durante 20 minutos. As soluções de Krebs a 2,8 mM e a 16,7 mM de glicose foram mantidas em banho a 37<sup>0</sup> C e em constante mistura carbogênica contendo 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> até o final do experimento. Os perfusatos foram coletados no tempo zero (momento em que houve a troca da solução basal pela solução estimulatória) e também nos tempos correspondentes a 12 e 20 minutos de

estimulação com glicose. Os perfusatos coletados foram congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para análise da insulina.

### **3.21 Secreção de insulina *in vitro***

A insulina liberada na perfusão *in vitro* das ilhotas pancreáticas de ratos machos das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle foi determinada através do método de radioimunoensaio utilizando-se “kit” comercial (MP Biomedicals®, Europa).

Em 100  $\mu\text{l}$  de amostra (plasma e perfusatos) pipetada em tubo de ensaio recoberto com anticorpo anti-insulina foram acrescentados de 900  $\mu\text{l}$  de insulina  $^{125}\text{I}$  reconstituída com tampão fosfato. Após agitação em vortex e repouso de 16 horas os tubos de ensaio foram vertidos. Em seguida, foram adicionados aos tubos de ensaio 4 ml de água destilada e posteriormente os mesmos foram novamente vertidos. Para a curva padrão, foi utilizado o mesmo procedimento e as seguintes concentrações: 0  $\mu\text{UI/ ml}$ ; 5,5  $\mu\text{UI/ ml}$ ; 15  $\mu\text{UI/ ml}$ ; 35  $\mu\text{UI/ ml}$ ; 70  $\mu\text{UI/ ml}$ ; 175  $\mu\text{UI/ ml}$  e 310  $\mu\text{UI/ ml}$ . A leitura do imunocomplexo formado foi realizada em contador gama C-12 (DPC Medlab®, EUA). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{UI/ ml}$ .

### **3.22 Conteúdo de GLUT2 e de AKT**

Outras ilhotas pancreáticas (120 ilhotas/ pâncreas) foram coletadas e centrifugadas a 3000 rpm por 2 minutos. Os *pellets* de ilhotas foram homogeneizados com solução de lise composta por 50 mM de HEPES, 1 mM de cloreto de magnésio, 10 mM de EDTA e 1% de TritonX-100 acrescida de inibidores de proteases. Os inibidores de proteases utilizados foram aprotinina diluída (10 mg/1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada), leupeptina diluída (10 mg/1ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) e fluoreto de fenilmetilsulfonil – PMSF diluído (17,4 mg/1 ml de etanol). Após 30 minutos de repouso em solução de lise, as amostras foram novamente centrifugadas a 3000 rpm por 2 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente foi realizada a dosagem da concentração das proteínas totais (Bradford, 1976) e foi feita a análise do conteúdo de GLUT2 e de AKT através da técnica de *Western Blotting* (Thorens, Sarkar *et al.*, 1988).

Amostras contendo 80 µg de proteínas foram submetidas aos SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%. Posteriormente, foi realizada a transferência para uma membrana de PVDF (Amersham®, Inglaterra) por 1 hora utilizando o sistema Semi-dry (Bio-RAD®, EUA). A membrana foi bloqueada com leite desnatado molico a 5% por 1 hora, seguida de incubação *overnight* com anticorpo primário específico diluído (1:1000). Os anticorpos primários utilizados foram: anti-GLUT2 de coelho e anti-AKT de coelho. As membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico diluído (1:1000) conjugado com biotina durante 1 hora. Em seguida, as membranas foram incubadas com estreptavidina diluída (1:1000) conjugada com peroxidase por 1 hora. As proteínas imunoreativas foram visualizadas através da marcação com 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloro – DAB. As bandas foram quantificadas por densitometria utilizando o programa *Image Jesus Software* (NIH, USA).

### **3.23 Análise estatística**

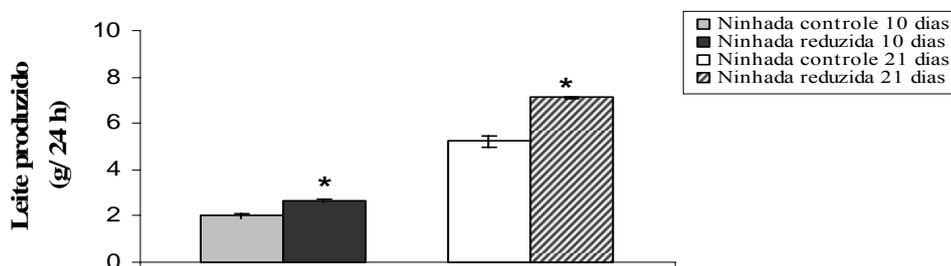
A análise dos dados foi realizada no programa estatístico *Graf Pad Prism 4* e os resultados foram apresentados como média aritmética e erro padrão. Utilizou-se o teste de Mann Whitney para verificar o nível de significância entre os grupos ( $p < 0,05$ ). E adotou-se o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para verificar o nível de significância intragrupo ( $p < 0,05$ ).

## *Resultados*

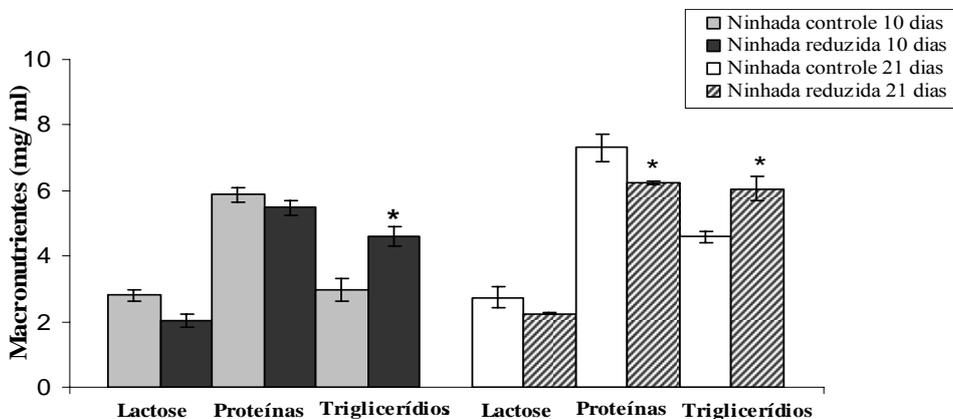
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Consumo e macronutrientes do leite de ratas Wistar

Observamos que a oferta de leite materno aumenta de forma diferenciada na lactação (Figura: 4). Os filhotes das ninhadas reduzidas tiveram um consumo de leite maior aos 10 dias ( $x= 2,66 \text{ g/24h} \pm 0,05$  e  $p= 0,004$ ) e aos 21 dias ( $x= 7,1 \text{ g/24h} \pm 0,05$  e  $p= 0,001$ ) de lactação, comparados aos filhotes das ninhadas controles respectivamente  $x= 2,01 \text{ g/24h} \pm 0,1$  e  $x= 5,22 \text{ g/24h} \pm 0,28$ . Além disso, destacamos que ao longo da lactação houve uma maior produção de triglicerídios no leite das lactantes das ninhadas reduzidas aos 10 dias ( $x= 4,60 \text{ mg/ml} \pm 0,29$  e  $p= 0,02$ ) e aos 21 dias ( $x= 6,06 \text{ mg/ml} \pm 0,35$  e  $p= 0,01$ ) em comparação ao leite das lactantes das ninhadas controles respectivamente  $x= 2,86 \text{ mg/ml} \pm 0,36$  e  $x= 4,58 \text{ mg/ml} \pm 0,01$ , vide figura 5.



**Figura 4: Estimativa do consumo de leite de ratas Wistar.** Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*) Diferença significativa entre o consumo de leite pelos filhotes das ninhadas reduzidas ( $n= 6$  ninhadas) e das ninhadas controles ( $n= 6$  ninhadas) no mesmo período de lactação ( $p<0,05$ ).



**Figura 5: Quantidade de macronutrientes do leite de ratas Wistar.** Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*) Diferença significativa entre os macronutrientes do leite produzido pelas lactantes das ninhadas controles ( $n= 6$ ) e reduzidas ( $n= 6$ ) no mesmo período de lactação ( $p<0,05$ ).

## 4.2 Crescimento naso-anal

Através da curva de crescimento naso-anal construída desde o nascimento até 1 ano de vida (Figura: 6) observamos que os ratos Wistar de ambos os grupos atingiram um *platô* de crescimento aproximadamente aos 90 dias de idade. E após análise por regressão linear foi verificado que até aos 90 dias o crescimento naso-anal não ocorreu de forma diferenciada entre os ratos das ninhadas reduzidas (coeficiente angular =  $0,198 \pm 0,01$ ) e os ratos das ninhadas controle (coeficiente angular =  $0,193 \pm 0,01$ ), vide figura: 7.

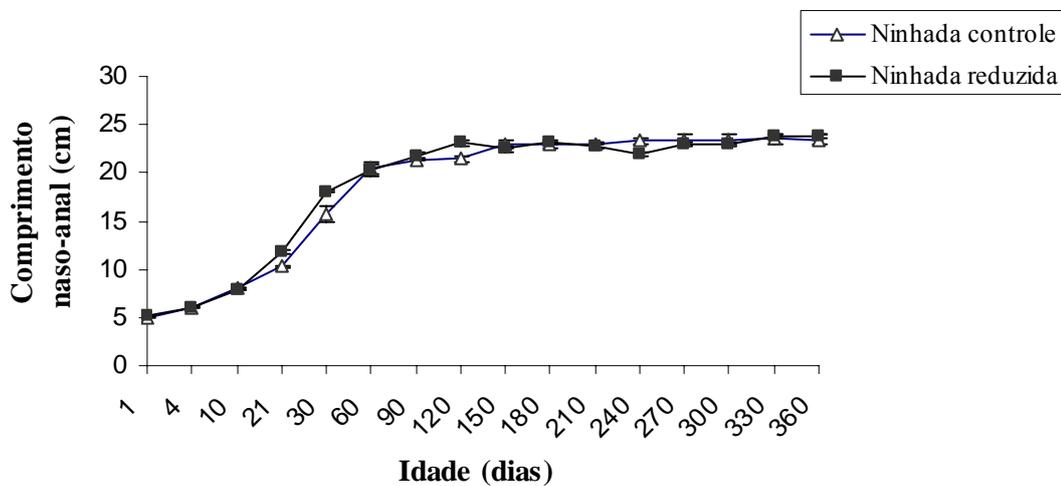


Figura 6: Curva de crescimento naso-anal. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.

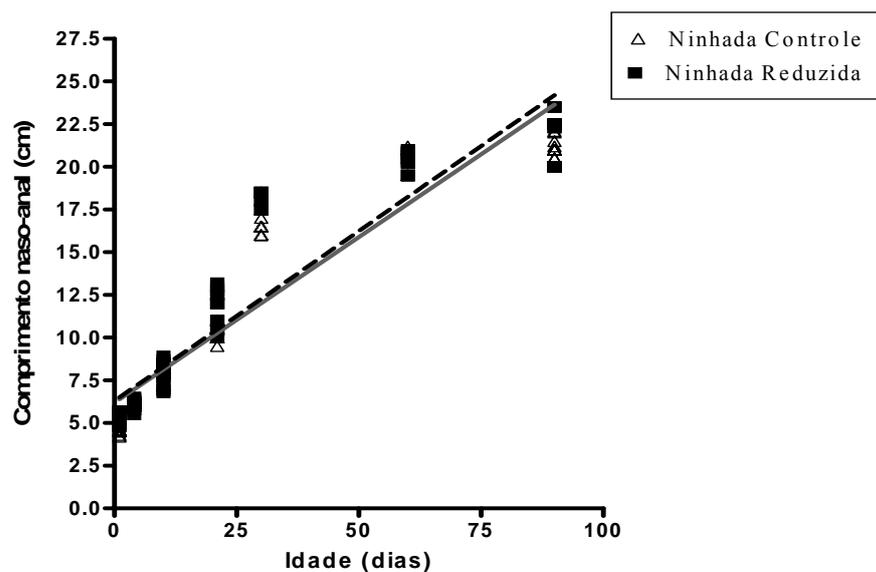


Figura 7: Regressão linear referente ao crescimento naso-anal.

### 4.3 Ganho de peso corporal

Através da curva de ganho de peso corporal observamos que os ratos Wistar de ambos os grupos apresentaram ganho de peso corporal na fase de crescimento e também na fase adulta (Figuras: 8 e 9). Após análise por regressão linear identificamos que o ganho de peso corporal ocorreu de forma diferenciada nos animais da ninhada reduzida (coeficiente angular =  $1,505 \pm 0,03$  e  $0,738 \pm 0,03$ ) em comparação aos animais da ninhada controle (variação do coeficiente angular =  $1,306 \pm 0,01$  e  $0,637 \pm 0,02$ ) respectivamente na fase de crescimento e na fase adulta, vide figuras 10 e 11.

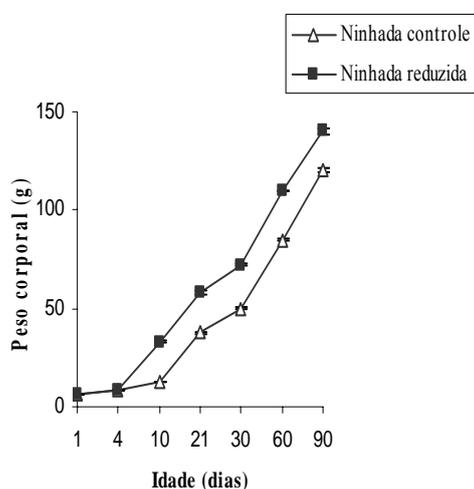


Figura 8: Curva de ganho de peso corporal na fase de crescimento.

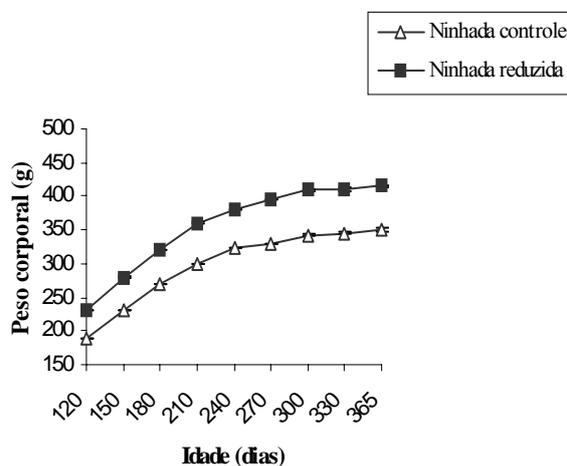


Figura 9: Curva de ganho de peso corporal na fase adulta.

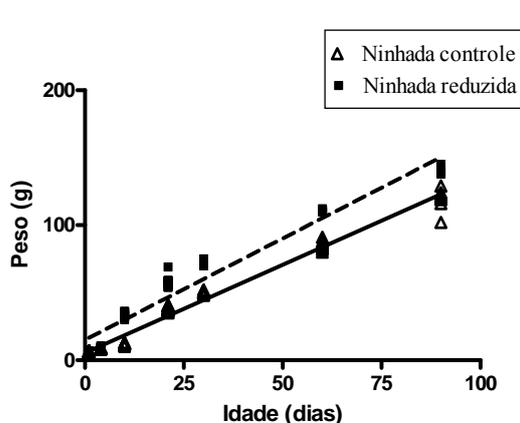


Figura 10: Regressão linear referente ao ganho de peso corporal na fase de crescimento.

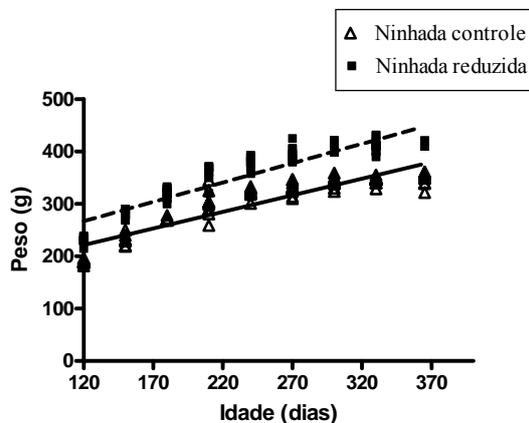
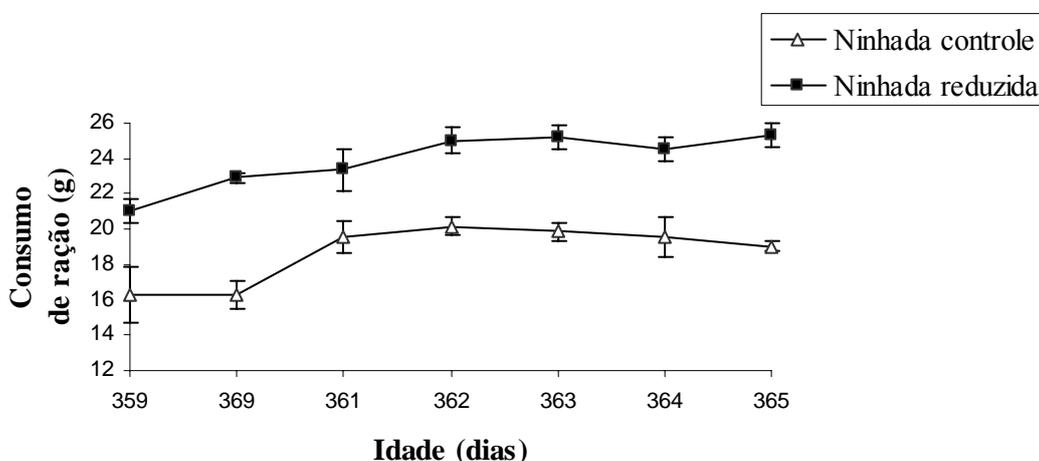


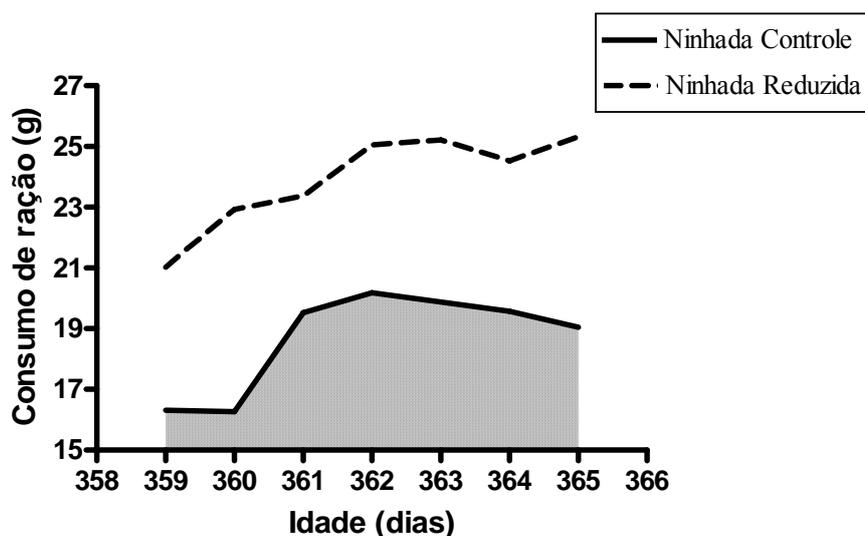
Figura 11: Regressão linear referente ao ganho de peso corporal na fase de adulta.

#### 4.4 Consumo alimentar na fase adulta

A partir dos dados do consumo de ração (Figura: 12) foram construídas as áreas das curvas referentes aos animais das ninhadas reduzidas e das ninhadas controle para obter um consumo alimentar representativo de todo o período estudado. Verificamos então que a área da curva representativa do consumo alimentar dos ratos Wistar machos adultos das ninhadas reduzidas ( $x = 144,2 \pm 3,07$  e  $p = 0,007$ ) foi significativamente maior em comparação com a das ninhadas controle ( $x = 113,1 \pm 3,26$ ), vide figura 13.



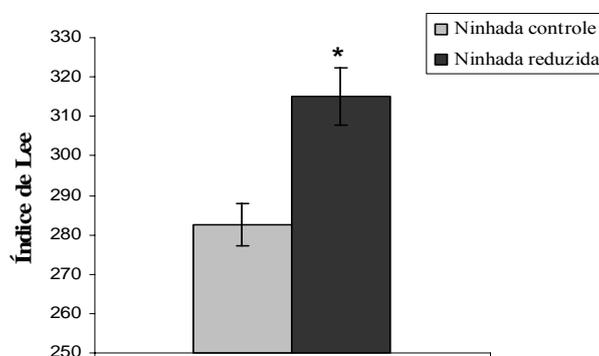
**Figura 12: Consumo alimentar de ratos Wistar adultos.** Os valores referentes ao consumo de ração de ratos Wistar das ninhadas controle ( $n = 5$  ninhadas) e das ninhadas reduzidas ( $n = 5$  ninhadas) foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.



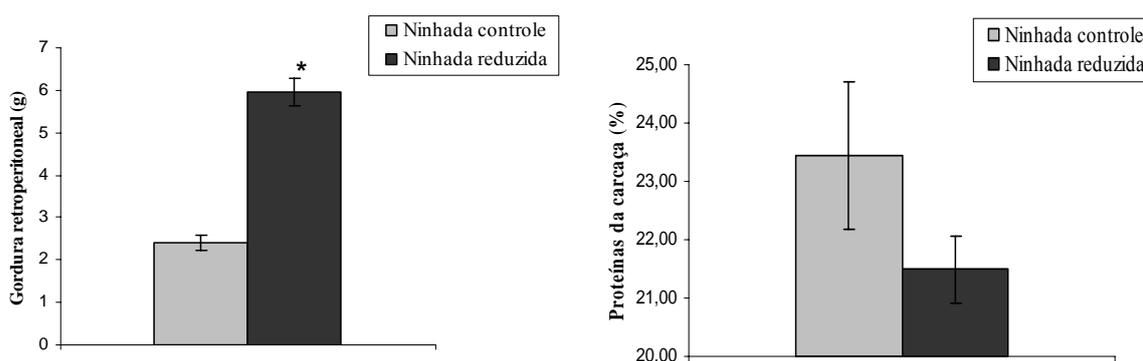
**Figura 13: Áreas das curvas representativas do consumo alimentar.**

#### 4.5 Índice de Lee, gordura retroperitoneal e proteínas da carcaça

Os ratos Wistar das ninhadas reduzidas apresentaram um maior Índice de Lee ( $x=315,1 \pm 5,85$  e  $p=0,002$ ) em comparação ao das ninhadas controle ( $x=282,5 \pm 4,6$ ), e também demonstraram uma maior quantidade de gordura da região retroperitoneal ( $x=5,9 \text{ g} \pm 0,34$  e  $p=0,0002$ ) em relação aos animais das ninhadas controle ( $x=2,4 \text{ g} \pm 0,18$ ) com 1 ano de idade, vide figuras: 14 e 15. Entretanto, não observamos diferença significativa no conteúdo de proteínas da carcaça entre os grupos nesta mesma idade (Figura: 16).



**Figura 14: Índice de Lee.** Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*) Diferença significativa entre as ninhadas controles (N= 8 ninhadas) e reduzidas (N= 8 ninhadas), sendo  $p<0,05$ .

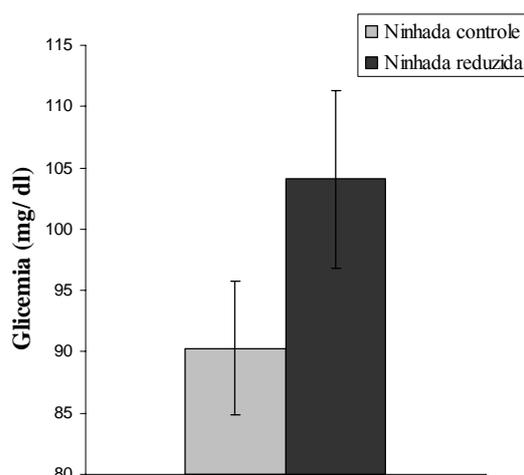


**Figura 15: Gordura retroperitoneal.** Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*) Diferença significativa entre as ninhadas controles (N= 8 ninhadas) e reduzidas (N= 8 ninhadas), sendo  $p<0,05$ .

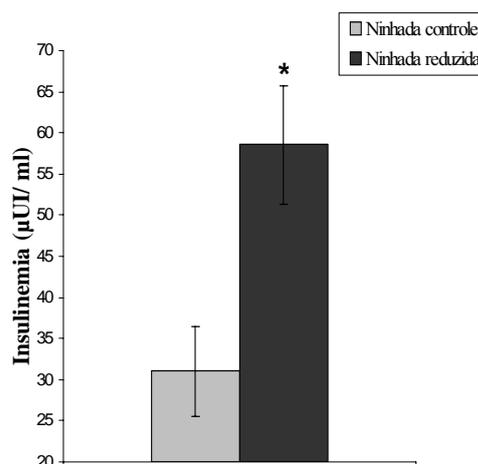
**Figura 16: Proteínas da carcaça.** Os valores referentes às proteínas da carcaça das ninhadas controles (N= 5 ninhadas) e reduzidas (N= 5 ninhadas) foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.

#### 4.6 Glicemia, insulinemia e lipidograma

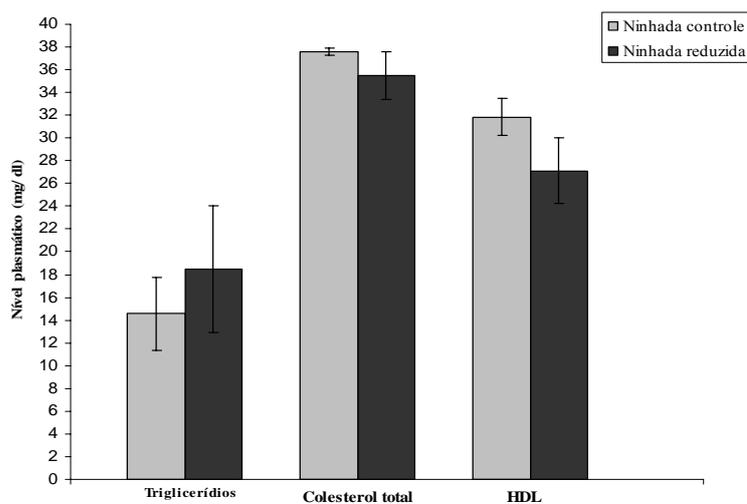
Os ratos Wistar das ninhadas reduzidas apresentaram elevação da insulinemia de jejum ( $x = 58,54 \mu\text{UI/ml} \pm 6,7$ ;  $p = 0,01$ ) em relação aos animais das ninhadas controle ( $x = 31 \mu\text{UI/ml} \pm 3,97$ ) com idade de 1 ano, vide figura 18. Contudo, não encontramos diferença significativa na glicemia de jejum, nem tão pouco nos lipídios plasmáticos entre os grupos nesta mesma idade (Figuras: 17 e 19).



**Figura 17: Glicemia.** Os valores referentes à glicemia de ratos Wistar das ninhadas controle ( $n = 10$  ninhadas) e reduzidas ( $n = 10$  ninhadas) foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.



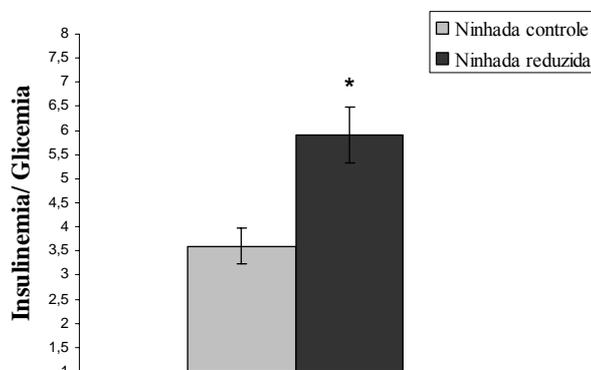
**Figura 18: Insulinemia.** Os valores referentes a insulinemia de ratos Wistar das ninhadas controle ( $n = 10$  ninhadas) e reduzidas ( $n = 10$  ninhadas) foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*) Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



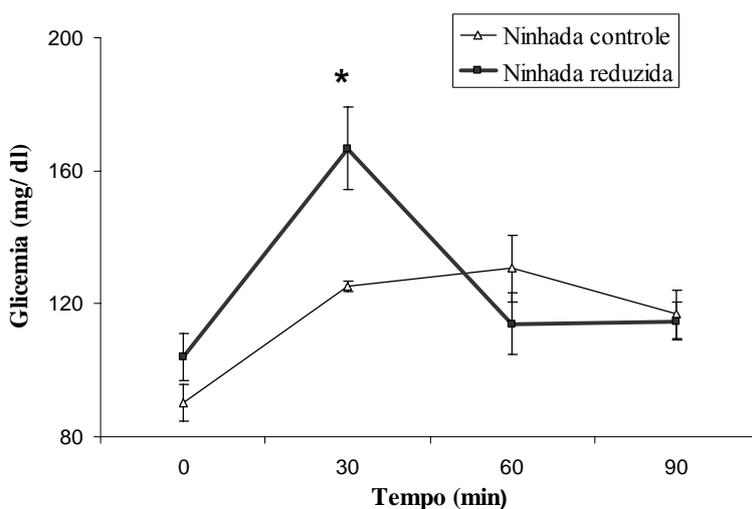
**Figura 19: Lipidograma.** Os valores referentes aos lipídios do plasma de ratos Wistar das ninhadas controles ( $n = 8$  ninhadas) e reduzidas ( $n = 8$  ninhadas) foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.

#### 4.7 Insulinemia/glicemia e teste de tolerância à glicose

Os ratos Wistar das ninhadas reduzidas com a idade de 1 ano apresentaram aumento da razão entre a insulinemia e a glicemia de jejum em comparação aos controles, respectivamente  $x = 5,90 \pm 0,58$  e  $x = 3,60 \pm 0,37$ ;  $p = 0,01$  (Figura: 20). Entretanto, após a realização do teste de tolerância à glicose identificamos um pico de elevação da glicemia aos 30 minutos após a administração (i.p.) de glicose e normalização da glicemia aos 60 e 90 minutos nos animais das ninhadas reduzidas em comparação aos animais das ninhadas controle (Figura: 21).



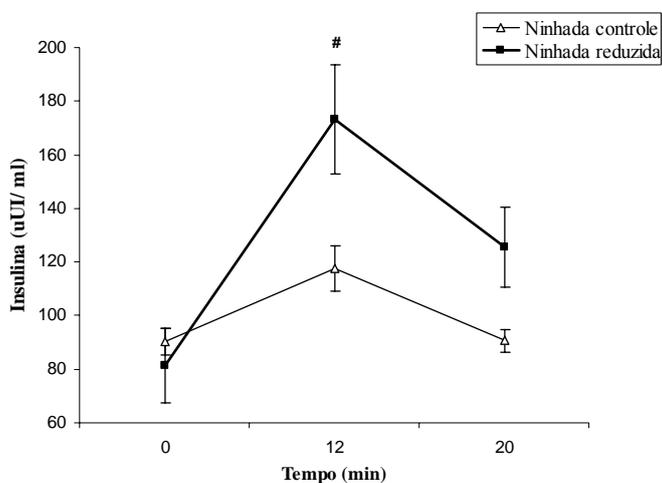
**Figura 20: Insulinemia/glicemia.** Os valores referentes à razão entre a insulina e a glicose plasmáticas dos ratos Wistar das ninhadas controle (N= 10 ninhadas) e reduzidas (N= 10 ninhadas) foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*) Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



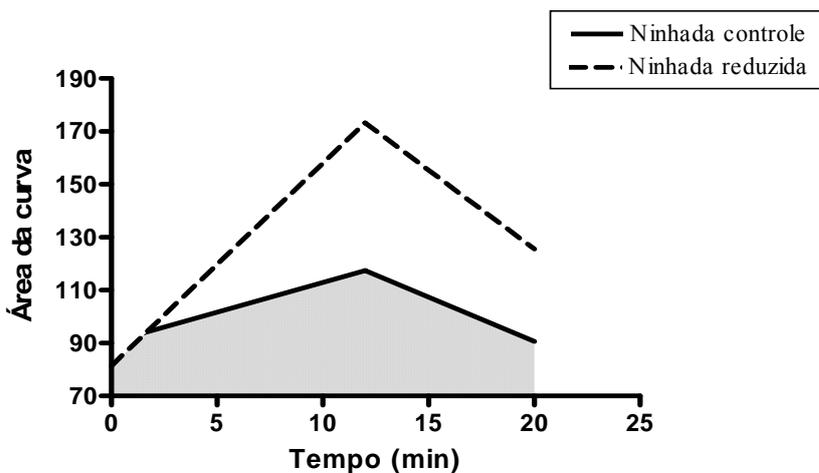
**Figura 21: Teste de tolerância à glicose.** Os valores referentes à glicemia dos ratos Wistar das ninhadas controles (n= 5 ninhadas) e das ninhadas reduzidas (n= 5 ninhadas) foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*) Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.8 Secreção de insulina *in vitro*

Através da área da curva representativa da secreção de insulina *in vitro* verificamos que os ratos Wistar das ninhadas reduzidas exibiram maior resposta hormonal em presença de solução de glicose a 16,7 mM no período de 20 minutos em comparação à resposta dos animais das ninhadas controle com a idade de 1 ano, respectivamente  $x = 2730 \pm 148,50$  e  $x = 2080 \pm 102,80$ ;  $p = 0,01$  (Figura: 23).



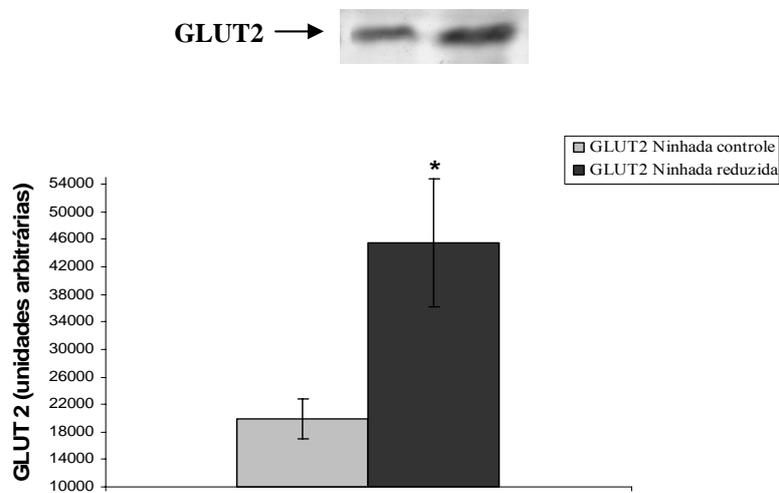
**Figura 22: Secreção de insulina *in vitro*.** Os valores referentes à insulina secretada pelos ratos Wistar das ninhadas controle ( $n = 5$  ninhadas) e reduzidas ( $n = 5$  ninhadas) foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. (#) Diferença significativa intra-grupo ( $p < 0,05$ ).



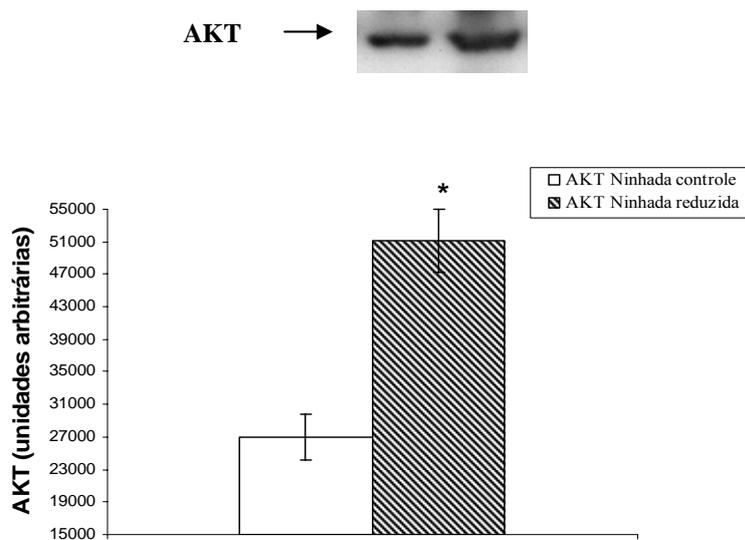
**Figura 23: Área da curva representativa da Secreção de Insulina *in vitro*.**

#### 4.9 Conteúdo de GLUT2 e de AKT

Identificamos alterações moleculares significativas nas ilhotas pancreáticas dos ratos Wistar das ninhadas reduzidas em presença de solução de glicose a 2,8 mM . Os mesmos apresentaram um maior conteúdo de GLUT2 ( $x = 45562 \text{ U.A.} \pm 9312$ ;  $p = 0,02$ ) e de AKT ( $X = 51163 \text{ U.A.} \pm 3837$ ;  $p = 0,002$ ) em comparação aos animais das ninhadas controle ( $x = 19957 \text{ U.A.} \pm 2895$  e  $26922 \text{ U.A.} \pm 2796$ ) na idade de 1 ano (Figuras: 24 e 25).



**Figura 24: Expressão de GLUT2.** Os valores referentes ao conteúdo de GLUT2 das ilhotas pancreáticas das ninhadas controles (n= 4 ninhadas) e reduzidas (n= 4 ninhadas) foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*) Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 25: Expressão de AKT.** Os valores referentes ao conteúdo de AKT das ilhotas pancreáticas das ninhadas controles (n= 6 ninhadas) e reduzidas (n= 6 ninhadas) foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*) Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

## *Discussão*

## 5 DISCUSSÃO

Os nossos resultados confirmam os relatos encontrados na literatura que demonstram a associação entre as alterações nutricionais no início da vida e efeitos prospectivos na vida adulta através dos fenômenos de Impressão e Programação Metabólica (Waterland e Garza, 1999). Corroboram também com os estudos que assinalam a importância da nutrição durante a lactação na determinação específica do processo de Programação Metabólica (Plagemann, Heidrich *et al.*, 1992; Plagemann, Harder *et al.*, 1999; Moura, Franco de Sá, *et al.*, 2002). Podemos desta forma afirmar que, assim como a gestação, a lactação também pode ser considerada um período crítico para o estabelecimento de efeitos deletérios a saúde em longo prazo.

A assertiva acima se justifica pelo amplo conhecimento da importância da lactação. Sabemos que a lactação é um processo fisiológico orientado principalmente para o estabelecimento de vias regulatórias que proporcionarão autonomia fisiológica ao organismo. Desta forma, o leite materno através de seus nutrientes, além de garantir o crescimento dos órgãos, induz a modificação de vias metabólicas celulares. Tais vias podem desenvolver-se normalmente ou adaptar-se a uma condição anômala como a falta ou o excesso de nutrientes. Entretanto, estas adaptações não são vantajosas e podem favorecer ao aparecimento de doenças na idade adulta (Lucas, 1998; Waterland e Garza, 1999).

Os nossos resultados demonstraram claramente um aumento da produção de leite materno pelas lactantes das ninhadas reduzidas aos 10 e 21 dias do período de lactação em comparação as lactantes das ninhadas controle. Este aumento na disponibilidade de nutrientes provavelmente induziu o redimensionamento do comportamento alimentar dos animais das ninhadas reduzidas (NR).

A ação dos nutrientes na modificação do comportamento alimentar na lactação está descrita na literatura. Para explicá-la, diversas hipóteses têm sido apresentadas. Por exemplo, um importante mecanismo que tem sido sugerido como responsável pela modificação do comportamento alimentar relaciona-se com a elevação dos níveis de insulina e de leptina no hipotálamo (Moura, Franco De Sa *et al.*, 2002). Nesta direção sugere-se que o aumento destes hormônios induz o aumento da galanina, um neuropeptídeo que estimula de forma potente o consumo de alimentos e o ganho de peso corporal (Plagemann, Harder *et al.*, 1999). Além disso, a insulina e a leptina são responsáveis pelo aumento das projeções de vias responsáveis

pelo controle da fome e da saciedade. A rede neural constituída por estas vias determina a modulação do comportamento alimentar, sendo tal dinâmica extremamente sensível à disponibilidade de alimentos (Pinto, Roseberry et al., 2004; McMillen e Robinson, 2005; Horvath e Bruning, 2006). Desta forma, pode-se sugerir que a idade real dos animais está associada a um padrão temporalmente adiantado da alimentação na lactação. Uma vez que o excesso de nutrientes no início da vida é capaz de modular o desenvolvimento do sistema neuroendócrino, reorganizando-o de forma permanente, os animais criados em ninhada reduzida continuam a apresentar hiperfagia na idade adulta. A manutenção do comportamento alimentar modificado (hiperfagia) foi demonstrada em nossos animais experimentais (NR), através do aumento da área da curva representativa do consumo alimentar.

Poderíamos dizer que, caso ficasse mantida a relação qualitativa equilibrada entre os nutrientes, provavelmente haveria um desenvolvimento harmonioso no qual o excesso de nutrientes seria equitativamente distribuído e utilizado pelas células. Entretanto, este não foi observado. Verificamos que o leite produzido pelas lactantes das ninhadas reduzidas apresentou modificação na composição da gordura exibindo uma maior concentração de seu constituinte principal, os triglicerídeos, e esta modificação qualitativa da relação entre os nutrientes pode ser sugerida como determinante nas respostas adaptativas observadas nos animais das NR.

Constatamos que ao final da fase de crescimento as NR atingiram um comprimento naso-anal semelhante aos animais das ninhadas controles (NC). O mesmo não foi observado em relação ao ganho de peso corporal. As NR demonstraram aumento do peso corporal de 52% aos 21 dias e de 25% na idade de 1 ano em comparação as NC. Na idade adulta, também identificamos que as NR apresentaram maior índice de Lee, elevação do conteúdo de gordura retroperitoneal e semelhante conteúdo de proteínas da carcaça comparado as NC. Tais resultados demonstram que os animais das NR na idade adulta possuem um aumento de peso corporal independente do crescimento longitudinal caracterizando um excesso de adiposidade, notadamente na região retroperitoneal. A gordura retroperitoneal faz parte do tecido adiposo visceral que é muito sensível à ação lipolítica das catecolaminas nos  $\beta$ -adrenorreceptores (Montague *et al.*, 1998; Kelley *et al.*, 2000; Van *et al.*, 1997; Wajchenberg, 2000; McTernan *et al.*, 2002; Glacchetti *et al.*, 2002). Além disso, o aumento da liberação de ácidos graxos livres (AGL) no plasma pode reduzir a formação de HDL e aumentar a produção de triglicerídeos, de VLDL e de LDL no fígado (Walton, Lees *et al.*, 1995; Gastaldelli, Miyazaki *et al.*, 2002; Gurnell, Savage *et al.*, 2003; Gungor, Bacha *et al.*, 2005).

Surpreendentemente, após análise bioquímica não encontramos alterações nos lipídios plasmáticos entre as NR e as NC.

Embora não tenhamos resultados experimentais relacionados ao estudo da relação lipólise/ lipogênese, é provável que mecanismos ativos associados à lipogênese sejam preponderantes na NR. A importância da lipogênese decorre do conhecimento que os adipócitos atuam como células endócrinas ao secretar fatores que são coletivamente chamados de adipocinas. Algumas das adipocinas conhecidas como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a adiponectina são fundamentais no metabolismo do organismo. Ambos são considerados mediadores da resistência à insulina por atuarem respectivamente na supressão de GLUT4 no tecido adiposo conduzindo a conseqüente diminuição da captação de glicose e por aumentar a sensibilidade à insulina por meio do aumento da utilização de glicose no músculo esquelético (Cigolini, Tonoli *et al.*, 1999; Rajala e Scherer, 2003). Além disso, a adiponectina também pode agir nas células  $\beta$  pancreáticas aumentando a secreção de insulina (Gu, Li *et al.*, 2006).

Em relação à insulina, constatamos níveis normais para a glicemia de jejum, elevação da insulinemia de jejum e aumento da razão insulinemia/glicemia. Em princípio, estes dados poderiam sugerir a presença de resistência periférica à insulina. Todavia, após a realização do teste de tolerância à glicose identificamos um pico de elevação da glicemia aos 30 minutos e normalização da mesma aos 60 e 90 minutos nas NR, indicando que a ação da insulina estaria comprometida no início de sua secreção e não em sua ação prolongada.

Ainda sobre a ação da insulina, os efeitos da hiperalimentação de ratos Wistar, no período de lactação, podem ser contraditórios. Por exemplo, é importante destacar que enquanto tecidos periféricos podem apresentar uma redução na captação de glicose, outro tecido, tal como o cardíaco, pode exibir aumento da sensibilidade à insulina. Sabemos por exemplo que em animais hiperalimentados no início da vida ocorre aumento da razão insulinemia/glicemia, denotando resistência à insulina. Entretanto, nos cardiomiócitos ocorrem alterações moleculares na cascata de insulina que mostram aumento da sensibilidade ao hormônio. Por exemplo, ocorre nos animais hiperalimentados o aumento da translocação de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4) e a elevação da expressão das enzimas Fosfatidilinositol-3-kinase (PI3-K), Janus Kinase-2 (JAK2), assim como, dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição-3 (STAT3) no início da vida (Pereira, Moreira *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, investigamos especificamente a secreção de insulina associada à capacidade de captação de glicose das células  $\beta$  pancreáticas através de seu transportador, a proteína GLUT2. Neste estudo constatamos que a hiperalimentação no início do

desenvolvimento gerou efeitos prospectivos na secreção de insulina *in vitro* e no conteúdo de GLUT2 das ilhotas pancreáticas.

Basicamente, após a perfusão de ilhotas pancreáticas *in vitro* verificamos um aumento da área da curva representativa da secreção de insulina durante 20 minutos de estimulação com solução de glicose a 16,7 mM nas NR em comparação as NC na idade de 1 ano. Nesta mesma idade, identificamos um maior conteúdo de GLUT2 nas ilhotas pancreáticas da NR no estado basal. Desta forma, tais dados sugerem que o aumento da secreção de insulina pode ser possível devido à uma maior captação de glicose nas células  $\beta$  pancreáticas em virtude de uma maior quantidade de GLUT2.

Nossos resultados corroboram com um outro estudo sobre os efeitos da hiperalimentação em ratos Wistar machos no início da vida que demonstrou um aumento da secreção de insulina *in vitro* em resposta à glicose aos 12 dias de vida e na idade adulta, acompanhado pelo aumento da expressão de GLUT2 em ilhotas pancreáticas (Srinivasan, Laychock *et al.*, 2003).

É interessante ressaltar que a privação nutricional no início da vida conduz a alterações semelhantes as da hiperalimentação na secreção de insulina e no conteúdo de GLUT2 na fase de crescimento. Por exemplo, foi demonstrado que a desnutrição de ratos Wistar no início da vida programa as ilhotas pancreáticas aumentando a secreção de insulina *in vitro* e a expressão de GLUT2 mediante estimulação com glicose (Lopes Da Costa, Sampaio De Freitas *et al.*, 2004).

Também, experimentos de clampeamento hiperglicêmico em ratos Wistar demonstraram que altas concentrações de glicose contribuem com o aumento de RNA mensageiro para GLUT2 (Chen, Alam *et al.*, 1990). Além disso, ilhotas pancreáticas isoladas de ratos Wistar mantidas em cultura por 1, 3, 7 e 10 dias em solução de glicose a 3 mM e a 30 mM, apresentam um aumento da expressão de GLUT2 na presença glicose a 30 mM comparada a cultura com glicose a 3 mM em todos os dias estudados (Tal, Liang *et al.*, 1992).

A diminuição da expressão de GLUT2 em ilhotas pancreáticas é típica em animais diabéticos e é considerada como um marcador da disfunção das células  $\beta$  pancreáticas podendo ser uma das causas da não responsividade destas células a elevadas concentrações de glicose. Após o isolamento e perfusão de ilhotas de camundongos geneticamente diabéticos (db/db) e não diabéticos (db/+) com soluções de glicose a 5 mM (basal) e 16,7 mM (estimulatória) foi verificada a diminuição da expressão de GLUT2 e níveis semelhantes de secreção de insulina em presença de solução basal e estimulatória de glicose nos animais db/db (Thorens, Wu *et al.*, 1992). Estes mesmos pesquisadores também realizaram o

transplante de ilhotas pancreáticas entre camundongos db/db e db/+, e através deste experimento puderam constatar que a diminuição da expressão de GLUT2 pode ser reversível. As ilhotas dos camundongos db/db foram transplantadas para o córtex renal dos camundongos db/+ e vice-versa. Duas semanas após o transplante, as ilhotas pancreáticas foram retiradas e após experimentos de *Western Blotting* foi constatada a reexpressão de GLUT2 nas ilhotas dos camundongos db/db e a supressão da expressão de GLUT2 nas ilhotas dos camundongos db/+.

Verificamos ainda que, além do aumento do conteúdo de GLUT2 as ilhotas pancreáticas das NR apresentam maior conteúdo de AKT no estado basal. Portanto, de acordo com os nossos resultados, a otimização da capacidade secretora das NR pode também estar relacionada com o aumento do conteúdo de AKT, que se destaca como um importante componente de processos adaptativos nas células  $\beta$  pancreáticas.

Sabe-se que a AKT ativa ou inibe várias vias relacionadas aos processos celulares de crescimento e diferenciação nas células  $\beta$  pancreáticas (Dickson e Rhodes, 2004). De acordo com a literatura, a superexpressão de AKT em camundongos transgênicos resultou em aumento da massa e do potencial de sobrevivência das células  $\beta$  pancreáticas (Jetton, Lausier *et al.*, 2005). Tais mecanismos permitem que estas células sejam capazes de adaptarem-se à mudanças no metabolismo. Por exemplo, na gravidez, a massa de células  $\beta$  pancreáticas aumenta em 70-80% através do processo de replicação e após o parto esta massa retorna ao normal através de mecanismos de apoptose (Scaglia, Smith *et al.*, 1995). Outra importante consideração é a habilidade das células  $\beta$  pancreáticas de adaptarem-se às alterações metabólicas causadas pela obesidade. Em roedores obesos não diabéticos, como os ratos Zucker, o crescimento da massa celular ocorre através do aumento do número e do tamanho das células  $\beta$  pancreáticas (Lingohr, Buettner *et al.*, 2002). Já em camundongos obesos e não diabéticos o crescimento da massa de células  $\beta$  pancreáticas ocorre principalmente devido ao aumento da replicação (Buttler, Janson *et al.*, 2003).

Além dos processos relacionados ao crescimento da massa de células  $\beta$  pancreáticas, a AKT pode estar envolvida no processo de secreção de insulina. A superexpressão da AKT pode resultar em alterações no processo de exocitose de insulina (Bernal-Mizrachi, Fatrai *et al.*, 2004). Especificamente, a via IRS2/ PI3K/ AKT pode regular os filamentos de actina, que são importantes para a extrusão de vesículas contendo grânulos de insulina (Lang, 1999; Cenni, Sirri *et al.*, 2003; Weir e Bonner-Weir, 2007).

Basicamente, o nosso trabalho confirma a importância e a potencialidade do modelo experimental de hiperalimentação que utiliza a redução de ninhada. Demonstramos que a

hiperalimentação na lactação induz a um processo de Programação Metabólica que manteria o organismo com um aumento de peso corporal na idade adulta, através da hiperfagia, impressa no início da vida, orientando prospectivamente o metabolismo em direção à síntese e ao depósito energético. Sugerimos que tal processo decorra do aumento da secreção de insulina, possivelmente induzida pelo aumento dos conteúdos de GLUT2 e de AKT nas células  $\beta$  pancreáticas.

*Conclusão*

## **6 CONCLUSÃO**

Ao estudar a influência da hipernutrição na lactação através do modelo de redução de ninhada em ratos Wistar machos podemos concluir que especificamente nas células  $\beta$  pancreáticas a hiperalimentação na lactação pode programar alterações permanentes na secreção de insulina possivelmente relacionadas ao aumento dos conteúdos de GLUT2 e de AKT na fase tardia do desenvolvimento.

## *Referências Bibliográficas*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ashcroft, S. J. The beta-cell K(ATP) channel. J Membr Biol, v.176, n.3, Aug 1, p.187-206. 2000.

Bennis-Taleb, N., C. Remacle, *et al.* A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. J Nutr, v.129, n.8, Aug, p.1613-9. 1999.

Bernal-Mizrachi, E., S. Fatrai, *et al.* Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet beta cells. J Clin Invest, v.114, n.7, Oct, p.928-36. 2004.

Bernardis, L. L. P., B. D. Correlation between Lee's 'Nutritive Ratio' and carcass fat content in weanling and adult female rats with ventromedial hypothalamic lesions. J. Endocr., v.40, p.527-528. 1968.

Berney, D. M., M. Desai, *et al.* The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. J Pathol, v.183, n.1, Sep, p.109-15. 1997.

Boschero, A. C. Acoplamento excitação-secreção nas células B pancreáticas. Arq Bras Endocrinol Metab, v.40, p.149-155. 1996.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Burcelin, R., V. Crivelli, *et al.* Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.282, n.4, Apr, p.E834-42. 2002.

Butler, A. E., J. Janson, *et al.* Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. Diabetes, v.52, n.9, Sep, p.2304-14. 2003.

Cenni, V., A. Sirri, *et al.* Targeting of the Akt/PKB kinase to the actin skeleton. Cell Mol Life Sci, v.60, n.12, Dec, p.2710-20. 2003.

Chen, L., T. Alam, *et al.* Regulation of beta-cell glucose transporter gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.11, Jun, p.4088-92. 1990.

Cigolini, M., M. Tonoli, *et al.* Expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human adipose tissue: a role for TNF-alpha? Atherosclerosis, v.143, n.1, Mar, p.81-90. 1999.

Deeney, J. T., M. Prentki, *et al.* Metabolic control of beta-cell function. Semin Cell Dev Biol, v.11, n.4, Aug, p.267-75. 2000.

Dickson, L. M. e C. J. Rhodes. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? Am J Physiol Endocrinol Metab, v.287, n.2, Aug, p.E192-8. 2004.

Ebina, Y., L. Ellis, *et al.* The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. Cell, v.40, n.4, Apr, p.747-58. 1985.

Erb, R. E., E. Sitarz, *et al.* Blood plasma and milk prolactin, and effects of sampling technique on composition of milk from suckled ewes. J Dairy Sci, v.60, n.2, Feb, p.197-203. 1977.

Finegood, D. T., L. Scaglia, *et al.* Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. Diabetes, v.44, n.3, Mar, p.249-56. 1995.

Flegal, K. M., M. D. Carroll, *et al.* Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. Jama, v.288, n.14, Oct 9, p.1723-7. 2002.

Gastaldelli, A., Y. Miyazaki, *et al.* Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab, v.87, n.11, Nov, p.5098-103. 2002.

Glass, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. Int J Biochem Cell Biol, v.37, n.10, Oct, p.1974-84. 2005.

Godfrey, K. M. e D. J. Barker. Fetal nutrition and adult disease. Am J Clin Nutr, v.71, n.5 Suppl, May, p.1344S-52S. 2000.

Gu, W., X. Li, *et al.* Globular adiponectin augments insulin secretion from pancreatic islet beta cells at high glucose concentrations. Endocrine, v.30, n.2, Oct, p.217-21. 2006.

Gungor, N., F. Bacha, *et al.* Youth type 2 diabetes: insulin resistance, beta-cell failure, or both? Diabetes Care, v.28, n.3, Mar, p.638-44. 2005.

Gurnell, M., D. B. Savage, *et al.* The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation. J Clin Endocrinol Metab, v.88, n.6, Jun, p.2412-21. 2003.

Haber, E. C., R. Secreção de insulina: Efeito autócrino da Insulina e Modulação por ácidos graxos. Arq Bras Endocrinol Metab, v.45. 2001.

Heimberg, H., A. De Vos, *et al.* Differences in glucose transporter gene expression between rat pancreatic alpha- and beta-cells are correlated to differences in glucose transport but not in glucose utilization. J Biol Chem, v.270, n.15, Apr 14, p.8971-5. 1995.

Hill, D. J. e B. Duvillie. Pancreatic development and adult diabetes. Pediatr Res, v.48, n.3, Sep, p.269-74. 2000.

Hill, D. J. e J. Hogg. Growth factor control of pancreatic B cell hyperplasia. Baillieres Clin Endocrinol Metab, v.5, n.4, Dec, p.689-98. 1991.

Horvath, T. L. e J. C. Bruning. Developmental programming of the hypothalamus: a matter of fat. Nat Med, v.12, n.1, Jan, p.52-3; discussion 53. 2006.

Ibge. Prevalência de déficit de peso, excesso de peso e obesidade na população com 20 ou mais anos de idade por sexo, segundo Unidades da Federação, Áreas urbanas dos Municípios, das Capitais e Regiões Metropolitanas. P. D. O. Familiares 2002-2003.

Jetton, T. L., J. Lausier, *et al.* Mechanisms of compensatory beta-cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase. Diabetes, v.54, n.8, Aug, p.2294-304. 2005.

Kaneto, H., Y. Nakatani, *et al.* Involvement of Oxidative Stress and the JNK Pathway in Glucose Toxicity. Rev Diabet Stud, v.1, n.4, Winter, p.165-74. 2004.

Kaung, H. L. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. Dev Dyn, v.200, n.2, Jun, p.163-75. 1994.

Lacy, P. E. e M. Kostianovsky. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes, v.16, n.1, Jan, p.35-9. 1967.

Lang, J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. Eur J Biochem, v.259, n.1-2, Jan, p.3-17. 1999.

Latorraca, M. Q., M. A. Reis, *et al.* Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. J Nutr, v.128, n.10, Oct, p.1643-9. 1998.

Leshner, A. I., V. A. Litwin, *et al.* A simple method for carcass analysis. Physiol Behav, v.9, n.2, Aug, p.281-2. 1972.

Lingohr, M. K., R. Buettner, *et al.* Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? Trends Mol Med, v.8, n.8, Aug, p.375-84. 2002.

Lopes Da Costa, C., M. Sampaio De Freitas, *et al.* Insulin secretion and GLUT-2 expression in undernourished neonate rats. J Nutr Biochem, v.15, n.4, Apr, p.236-41. 2004.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, v.193, n.1, Nov, p.265-75. 1951.

Lucas, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. J Nutr, v.128, n.2 Suppl, Feb, p.401S-406S. 1998.

McMillen, I. C. e J. S. Robinson. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. Physiol Rev, v.85, n.2, Apr, p.571-633. 2005.

Mota, C. M., Mar. Exercício e síndrome metabólica. v.12, p.185-193. 2006.

Moura, A. S., C. C. Franco De Sa, *et al.* Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin. Braz J Med Biol Res, v.35, n.5, May, p.617-22. 2002.

Niswender, K. D., D. G. Baskin, *et al.* Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. Trends Endocrinol Metab, v.15, n.8, Oct, p.362-9. 2004.

Oliveira, E. S., Mla; Lima, Mda. Prevalência de Síndrome Metabólica em Uma Área Rural do Semi-árido Baiano. Arq Bras Endocrinol Metab, v.50. 2006.

Park, Y. W., S. Zhu, *et al.* The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. Arch Intern Med, v.163, n.4, Feb 24, p.427-36. 2003.

Patti, M. E. e C. R. Kahn. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. J Basic Clin Physiol Pharmacol, v.9, n.2-4, p.89-109. 1998.

Pende, M. mTOR, Akt, S6 kinases and the control of skeletal muscle growth. Bull Cancer, v.93, n.5, May 1, p.E39-43. 2006.

Pereira, R. O., A. S. Moreira, *et al.* Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts. Regul Pept, v.136, n.1-3, Sep 11, p.117-21. 2006.

Pessin, J. E. e A. R. Saltiel. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. J Clin Invest, v.106, n.2, Jul, p.165-9. 2000.

Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal Biochem, v.83, n.2, Dec, p.346-56. 1977.

Pine, A. P., N. S. Jessop, *et al.* Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. 3. The effects of dietary protein restriction and stage of lactation on milk composition. Br J Nutr, v.72, n.6, Dec, p.815-30. 1994.

Pinto, S., A. G. Roseberry, *et al.* Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. Science, v.304, n.5667, Apr 2, p.110-5. 2004.

Plagemann, A., T. Harder, *et al.* Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. Brain Res, v.836, n.1-2, Jul 31, p.146-55. 1999.

Plagemann, A., I. Heidrich, *et al.* Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. Exp Clin Endocrinol, v.99, n.3, p.154-8. 1992.

Popkin, B. M. The nutrition transition and obesity in the developing world. J Nutr, v.131, n.3, Mar, p.871S-873S. 2001.

\_\_\_\_\_. An overview on the nutrition transition and its health implications: the Bellagio meeting. Public Health Nutr, v.5, n.1A, Feb, p.93-103. 2002.

Puoane, T., K. Steyn, *et al.* Obesity in South Africa: the South African demographic and health survey. Obes Res, v.10, n.10, Oct, p.1038-48. 2002.

Ramos, M. R., Am; Moriguchi, Eh; Ramos, Ss; Zimmer, Pm. Prevalência de sobrepeso e obesidade e sua associação com a síndrome metabólica em uma amostra de idosos. AMRIGS, v.50, p.307-312. 2006.

Rajala, M. W. e P. E. Scherer. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. Endocrinology, v.144, n.9, Sep, p.3765-73. 2003.

Ravelli, G. P., Z. A. Stein, *et al.* Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. N Engl J Med, v.295, n.7, Aug 12, p.349-53. 1976.

Russell, J. A. Milk yield, suckling behaviour and milk ejection in the lactating rat nursing litters of different sizes. J Physiol, v.303, Jun, p.403-15. 1980.

Saltiel, A. R. e C. R. Kahn. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature, v.414, n.6865, Dec 13, p.799-806. 2001.

Sartorelli, D. F., Lj. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. Cad Saude Publica, v.19, p.29-36. 2003.

Sawaya, A. L. e S. Roberts. Stunting and future risk of obesity: principal physiological mechanisms. Cad Saude Publica, v.19 Suppl 1, p.S21-8. 2003.

Scaglia, L., F. E. Smith, *et al.* Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. Endocrinology, v.136, n.12, Dec, p.5461-8. 1995.

Sichieri, R., D. C. Coitinho, *et al.* High temporal, geographic, and income variation in body mass index among adults in Brazil. Am J Public Health, v.84, n.5, May, p.793-8. 1994.

Sichieri, R., K. S. Siqueira, *et al.* Obesity and abdominal fatness associated with undernutrition early in life in a survey in Rio de Janeiro. Int J Obes Relat Metab Disord, v.24, n.5, May, p.614-8. 2000.

Siervogel, R. M., A. F. Roche, *et al.* Patterns of change in weight/stature<sup>2</sup> from 2 to 18 years: findings from long-term serial data for children in the Fels longitudinal growth study. Int J Obes, v.15, n.7, Jul, p.479-85. 1991.

Srinivasan, M., S. G. Laychock, *et al.* Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. Exp Biol Med (Maywood), v.228, n.1, Jan, p.15-23. 2003.

Tal, M., Y. Liang, *et al.* Expression and function of GLUT-1 and GLUT-2 glucose transporter isoforms in cells of cultured rat pancreatic islets. J Biol Chem, v.267, n.24, Aug 25, p.17241-7. 1992.

Thorens, B., H. K. Sarkar, *et al.* Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. Cell, v.55, n.2, Oct 21, p.281-90. 1988.

Thorens, B., Y. J. Wu, *et al.* The loss of GLUT2 expression by glucose-unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. J Clin Invest, v.90, n.1, Jul, p.77-85. 1992.

Waterland, R. A. e C. Garza. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. Am J Clin Nutr, v.69, n.2, Feb, p.179-97. 1999.

Walton, C., B. Lees, *et al.* Relationships between insulin metabolism, serum lipid profile, body fat distribution and blood pressure in healthy men. Atherosclerosis, v.118, n.1, Nov, p.35-43. 1995.

Weir, G. C. e S. Bonner-Weir. A dominant role for glucose in beta cell compensation of insulin resistance. J Clin Invest, v.117, n.1, Jan, p.81-3. 2007.

White, M. F., S. E. Shoelson, *et al.* A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. J Biol Chem, v.263, n.6, Feb 25, p.2969-80. 1988.

Wicksteed, B., C. Alarcon, *et al.* Glucose-induced translational control of proinsulin biosynthesis is proportional to preproinsulin mRNA levels in islet beta-cells but not regulated via a positive feedback of secreted insulin. J Biol Chem, v.278, n.43, Oct 24, p.42080-90. 2003.

Wild, S., G. Roglic, *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care, v.27, n.5, May, p.1047-53. 2004.

Zecchin, H. C., Jbc; Saad, Mja. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. v.14. 2004.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)