

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CIRURGIA, NUTRIÇÃO E METABOLISMO

EFEITO DA RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL COM DIETA À
BASE DE FARINHA DE SOJA SOBRE A VIA DE SINALIZAÇÃO
DA INSULINA NO FÍGADO DE RATOS

NAOEL HASSAN FERES

CUIABÁ - MT

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

NAOEL HASSAN FERES

**EFEITO DA RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL COM DIETA À
BASE DE FARINHA DE SOJA SOBRE A VIA DE SINALIZAÇÃO
DA INSULINA NO FÍGADO DE RATOS**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, área de
concentração Cirurgia, Nutrição e Metabolismo -
Universidade Federal de Mato Grosso, para
obtenção do título de Mestre.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Queiroz Latorraca

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marise Auxiliadora de Barros Reis

**CUIABÁ - MT
Outubro de 2007**

DEDICATÓRIA

*Ao meu querido pai Hassan Kamal Fares,
“in memoriam”, pelo exemplo de vida e coragem...*

*À minha mãe Ramzie H. Fares, pelo carinho,
paciência e confiança depositada em mim...*

Amo vocês!!

Certeza (Fernando Sabino)

De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...

Amizade (Ivone Boechat)

A amizade é

o mais belo afluente do amor, ela ajuda a resolver, com paciência,
as complicadas equações da convivência humana.

A amizade é

tão forte quanto o amor, ela educa o amor, sinalizando o caminho da
coerência, apontando as veredas da justiça, controlando os excessos da paixão.

A amizade é

um forte elo que une pessoas na corrente do querer.

Amizade é

cola divina, cola demais, pode doer.

A amizade

tem muito mais juízo que o amor, quando ele se esgota e cisma
de ir embora, ela se propõe a ficar, vigiando o
sentimento que sobrou.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por...

Eu existir e vencer mais uma etapa na minha vida;

Pelo caminho iluminado e preenchido com pessoas amigas, incentivadoras, compreensivas e companheiras e,

Pela existência da minha família.

Infinitos agradecimentos à minha orientadora Prof^a Dra. Márcia Q. Latorraca, pelo seu brilhantismo e valiosa orientação, paciência, confiança e dedicação no desenvolvimento dos trabalhos.

À Prof^a Dra. Marise A. B. Reis, pelo exemplo de ética profissional, orientação e pela sua ajuda competente e constante.

À Prof^a Dra. Vanessa C. Arantes, pela grande amizade, dedicação e incentivo durante todo esse tempo, com orientação permanente e competente em todas as etapas do trabalho e pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação.

Ao Prof^o Dr. Roberto V. Veloso, pela colaboração efetiva durante todo o experimento e pela sua valiosa amizade.

Ao Prof^o Dr. Luiz Fabrício Stoppiglia, pela disposição, contribuição na realização dos experimentos e pelas sugestões pertinentes apresentadas no exame de qualificação.

À Prof^a Dra. Nair Honda Kawashita, pelo carinho, contribuição intelectual, e por gentilmente ter cedido seu laboratório para realização de alguns experimentos.

Aos professores e doutores da UNICAMP, Antônio C. Boschero, Everardo M. Carneiro e Lício A. Velloso, pela colaboração na realização da pesquisa.

Às professoras Dra. Maria Helena Gaiva e Dra. Maria Salete F. Martins pelo carinho e atenção.

À Diretoria Clínica e à Gerência de Nutrição e Dietética do HUJM e a todos os colegas e amigos do Serviço de Nutrição, pela liberação, apoio e confiança, e por permitirem a realização dessa pesquisa.

À Silvia Regina L. Reis, parceira e amiga de mestrado, pela amizade, dedicação, confiança e ainda, pelos bons momentos vividos e até mesmo aqueles difíceis, porém, superados.

Às alunas de iniciação científica, Bárbara L. Botosso, Letícia I. M. de Souza e Talita S. F. Gonçalves, pela amizade, conversas, risadas e pelas participações nos experimentos durante todo esse tempo.

Às companheiras de mestrado, Maristela Milanski e Vera L. Moretto, pelo carinho, amizade, colaboração e pelos momentos de alegria compartilhados.

Às minhas eternas amigas, Lílian Ferreira dos Santos, Viviane M. Tavares, Ira Soraya Arruda, Diana D. Nascimento, Aline Dias de Moura e Margareth Arruda pela confiança, carinho e incentivo durante a minha jornada.

À Marciane Milanski, pela amizade, carinho e apoio na realização do trabalho.

Ao técnico do laboratório, Celso R. Afonso, pela atenção, apoio e amizade cultivada ao longo desses 2 anos.

Aos Técnicos e alunos de mestrado do Laboratório de Química da UFMT, pela colaboração e troca de experiência.

A todos aqueles, presentes ou distantes, que direta ou indiretamente me apoiaram, incentivaram e torceram por mais uma etapa vitoriosa da minha vida.

Meu agradecimento e respeito aos animais de laboratório, que sem prever, doaram a vida à pesquisa.

À Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), em especial à Faculdade de Ciências Médicas (FCM) e ao Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos, por essa tão grande oportunidade.

À FAPEMAT e CNPq pelo apoio financeiro, o qual se tornou possível à realização dessa pesquisa.

À Corn Products do Brasil e Perdigão Indústria LTDA pela doação de alguns ingredientes utilizados na produção de dieta dos animais.

*“Numa amizade não importa o tempo e a distância,
mas sim o quão verdadeira ela é”.*

Obrigada a todos!

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição das dietas controle, hipoprotéica e à base de farinha de soja utilizadas na primeira e segunda fase experimental (g/Kg).....	14
Quadro 2 – Composição nutricional da farinha integral de soja micronizada inativa em 100g.	14
Quadro 3 – Composição de aminoácidos da farinha integral de soja micronizada inativa da caseína.	15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características metabólicas e hormonais de ratos adultos mantidos com dieta à base de caseína (CC e RC), farinha integral de soja (CS e RS) e dieta hipoprotéica (HP) após o desmame.....	26
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Transdução do sinal da ação da insulina (Adaptado de acordo com Saliel & Kahn 2001).	02
Figura 2 - Representação por “immunoblot” da expressão protéica do IR (A), IRS-1 (B), p85 (C), p110 (D) e Akt (E), no fígado de ratos adultos mantidos com dieta controle (grupos CC e RC), farinha de soja (grupos CS e RS) e hipoprotéica (grupo HP).	29
Figura 3 - Representação por “immunoblot” mostrando o percentual de aumento da estimulação da autofosforilação do IR (A), IRS-1 (B), a associação do IRS-1/PI3-kinase (p85) (C) e fosforilação da Akt (D), no fígado de ratos adultos mantidos com dieta controle (grupos CC e RC), farinha de soja (grupos CS e RS) e hipoprotéica (grupo HP).	30

LISTA DE ABREVIATURAS

α – Alfa

β – Beta

Akt/PKB – Proteína serina/treonina quinase B

AMPC – AMP cíclico

Anti-pY – Anti-fosfotirosina

ATP – Trifosfato de adenosina

Ca²⁺ – Cátions cálcio

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

GLUT 4 – Transportador de glicose 4

GSK3 – Glicogênio sintetase quinase 3

GTT – Teste de tolerância à glicose

HCl – Ácido clorídrico

IR – Receptor de insulina

IRS-1 – Substrato 1 do receptor de insulina

IRS-2 - Substrato 2 do receptor de insulina

IRSs – Substratos do receptor de insulina

KOH – Hidróxido de potássio

NaCl – Cloreto de sódio

p110 – Subunidade catalítica da PI3-quinase

p85 – Subunidade regulatória da PI3-quinase

PI3-k – Fosfatidilinositol 3-quinase

PKA – Proteína quinase A

PMSF - Fluoreto de fenilmetil sulfonila

RNA – Ácido ribonucléico

SDS-PAGE – gel de poliacrilamida para eletroforese dodecil sulfato de sódio

SH2 – Domínios protéicos com homologia ao proto oncogene Src2 (Segunda homologia do src)

Shc – Molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina

Tris – Tri(hidroximetil)-aminometano

UCP3 – Proteína desacopladora 3

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
I – INTRODUÇÃO	01
II – JUSTIFICATIVA	08
III – OBJETIVOS	10
3.1 – Geral	10
3.2 – Específicos	10
IV - MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1. Animais	11
4.2. Dietas	12
4.3. Procedimentos Experimentais	16
4.3.1. Teste Subcutâneo de Tolerância à Glicose (GTT)	16
4.3.2. Amostras e análises.....	16
4.3.3. Extração de tecidos “imunoblot” e imunoprecipitado	17
4.3.4. Determinações bioquímicas	19
4.3.4.1. Albumina	19
4.3.4.2. Glicose	19
4.3.4.3. Triglicérides	19
4.3.4.4. Glicogênio Hepático	20
4.3.4.5. Insulina	20
4.3.4.6. Glucagon.....	22
4.4. Análises estatísticas	22
VI – RESULTADOS	24
VII – DISCUSSÃO	31
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

Desnutrição intra-uterina tem sido associada ao diabetes tipo 2 na vida adulta e o consumo de alimentos à base de soja parece ser benéfico na prevenção e tratamento de doenças. Investigamos os efeitos da recuperação nutricional com dieta à base de soja na via de transdução do sinal da insulina, em fígado de animais submetidos à restrição protéica na vida intra-uterina. Prole de mães alimentadas com 17% ou 6% proteína (caseína) durante a prenhez e lactação foi mantida com dieta à base de caseína (CC e RC) ou de soja (CS e RS), ambas com 17% de proteína, desde o desmame até os 90 dias de vida. Grupos CS e RS apresentaram maior concentração de insulina sérica, ΔI após carga de glicose e razão $\Delta I / \Delta G$ e concentração de glicogênio hepático diminuído em relação aos grupos CC e RC. O ΔG foi menor no grupo RC do que no grupo CC, mas similar nos grupos RS e CS. Os níveis de expressão protéica IR e IRS-1 foram menores nos ratos recuperados do que nos controles e naqueles alimentados com dieta à base de soja. No grupo RS os níveis de expressão protéica da p85 foram maiores do que o grupo RC, ao passo que nos ratos CS a expressão da proteína foi menor do que nos ratos CC. A expressão da p110 foi menor em animais do grupo CS em relação ao grupo CC e similar nos grupos recuperados (RS e RC). A fosforilação em tirosina do IR no fígado, foi significativamente menor nos ratos recuperados do que nos controles, enquanto a fosforilação em tirosina do IRS-1 foi similar nos grupos recuperados e menor nos grupos controles. A associação do IRS-1 a p85/PI3-quinase foi menor nos ratos RS em relação ao RC e nos CS comparados com ratos CC. Não houve diferença na expressão protéica da Akt entre os grupos, mas a fosforilação da proteína foi menor nos grupos de ratos alimentados com dieta à base de soja em comparação aos ratos alimentados com dieta à base de caseína. Assim, os ratos recuperados com dieta de soja desenvolveram

resistência hepática à insulina, devido, ao menos em parte, ao aumento da expressão da p85, que favoreceu a redução da associação do IRS-1/PI3-quinase. Nos ratos controles a resistência à insulina parece ter sido resultado da redução da fosforilação do IRS-1 que determinou menor associação do IRS-1 a PI3-quinase.

Palavras chaves: Rato, Fígado; Glicogênio hepático; Soja; Resistência à insulina; Desnutrição.

ABSTRACT

Malnutrition in early life has been associated to type 2 diabetes in adulthood and the consumption of soy-based foods appears to be useful in the treatment and prevention this disease. We investigated the effects of nutritional recovery with soybean diet on the insulin signal transduction pathway in the liver from animals submitted to protein restriction in early life. Rats from mothers fed with 17% or 6% protein (casein) during pregnancy and lactation were maintained with 17% casein (CC and LC groups) or soybean (CS and LS groups) diet after weaning until 90d age. CS and LS groups had raised basal serum insulin concentration, ΔI after glucose load and $\Delta I/\Delta G$ ratio and low hepatic glycogen concentrations in relation to CC and LC groups. The ΔG was lower in LC than in the CC groups, but similar to LS and CS groups. The IR and IRS-1 levels were lower in recovered than in control rats and in those fed with soybean diet. In LS group the p85 levels were higher than in LC group, whereas in CS rat the expression of this protein was lower than in CC rats. The p110 expression was lower in the CS in relation to CC group and similar in LS and LC groups. The IR tyrosine phosphorylation was significantly lower in recovered than in control rats. The IRS-1 tyrosine phosphorylation was similar in the LS and LC groups and lower CS than in CC groups. IRS-1-p85/PI 3-kinase association was lower LS rats in relation to LC and in the CS compared with CC rats. The Akt expression did not differ among groups, but the Akt phosphorylation was lower in CS and LS groups than in CC and LC groups. Thus, nutritional recovery with soybean diet produced liver insulin resistance due, at least in part, to increased expression of p85 that favored the reduction of IRS-1/PI3-kinase association. In control rats, the insulin resistance appears to have resulted of reduced of phosphorylation IRS-1 than determinate lower IRS-1-p85/PI3-kinase association.

Key words: Rat, Liver; Hepatic glycogen; Soybean; Insulin resistance; Malnutrition.

FICHA CATALOGRÁFICA

F349e Feres, Naoel Hassan

Efeito da recuperação nutricional com dieta à base de farinha de soja sobre a via de sinalização da insulina no fígado de ratos / Naoel Hassan Feres. – 2007.

xiii, 44p. : il. ; color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Ciências Médicas, Mestrado em Ciências da Saúde, Área: Cirurgia, Nutrição e Metabolismo, 2007.

“Orientação: Prof.^a Dr.^a Márcia Queeiroz Latorraca”.

“Co-orientador: Marise Auxiliadora de Barros Reis”

CDU – 613.2.038:633.34:57.082

Índice para Catálogo Sistemático

1. Nutrição – Soja – Animais de laboratório
2. Soja – Dieta nutricional
3. Dieta nutricional – Resistência à insulina – Ratos
4. Desnutrição – Animais de laboratório
5. Glicogênio hepático – Animais de laboratório
6. Ratos – Recuperação nutricional – Soja

I - INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da insulina em 1921 por Frederick Banting e Charles Best, muito esforço tem sido dedicado ao entendimento do mecanismo molecular de ação desse hormônio (1). Esse interesse justifica-se pela alta prevalência de resistência à insulina e, pelo fato desta estar envolvida na patogênese de doenças como obesidade, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares.

A insulina é um hormônio essencial para o desenvolvimento, crescimento, diferenciação celular e tem efeitos metabólicos potentes (1). É secretada pelas células β das ilhotas pancreáticas, em resposta à glicose e aminoácidos (2,3,4).

A insulina é um importante modulador da homeostase glicêmica (1), por inibir produção hepática e aumentar a captação de glicose principalmente no músculo e nos adipócitos (5,6). No fígado, a insulina estimula a glicólise e a glicogênese, inibe a gliconeogênese e glicogenólise, e promove a síntese de lipídios e de proteínas. No tecido adiposo, a insulina inibe a lipólise, no tecido muscular a proteólise e no pâncreas modula a secreção de glucagon (7,8).

Todos esses processos são desencadeados pela ligação da insulina ao seu receptor de membrana que é altamente regulado e específico (2). O receptor de insulina (IR) é uma glicoproteína heterotetramérica, com atividade tirosina quinase intrínseca (2,9,10). A ligação da insulina induz uma alteração conformacional do receptor, que se torna capaz de autofosforilar ativando a fosforilação de resíduos em tirosina de uma família de substratos denominados substratos do receptor de insulina (IRS) (7,2). O IRS-1 e o IRS-2, quando fosforilados em tirosina, se ligam e ativam proteínas com domínio SH2, como a PI 3-quinase (PI3-K) (11). A PI3-quinase é uma serina/treonina quinase, identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma

subunidade regulatória (p85) (9,12). A ligação da subunidade p85 da PI3-K ao IRS-1 estimula a atividade quinase da subunidade catalítica p110. Como resultado ocorre fosforilação de uma serina quinase denominada Akt/PKB, que dentre outras funções, participa diretamente do transporte de glicose dependente de insulina (13,14). A Akt/PKB também catalisa a fosforilação em serina da glicogênio sintetase quinase 3 (GSK3), inativando-a e, conseqüentemente, ativando a glicogênio sintetase. O resultado dessas reações é o aumento da síntese de glicogênio (15,16,17) (Figura 1).

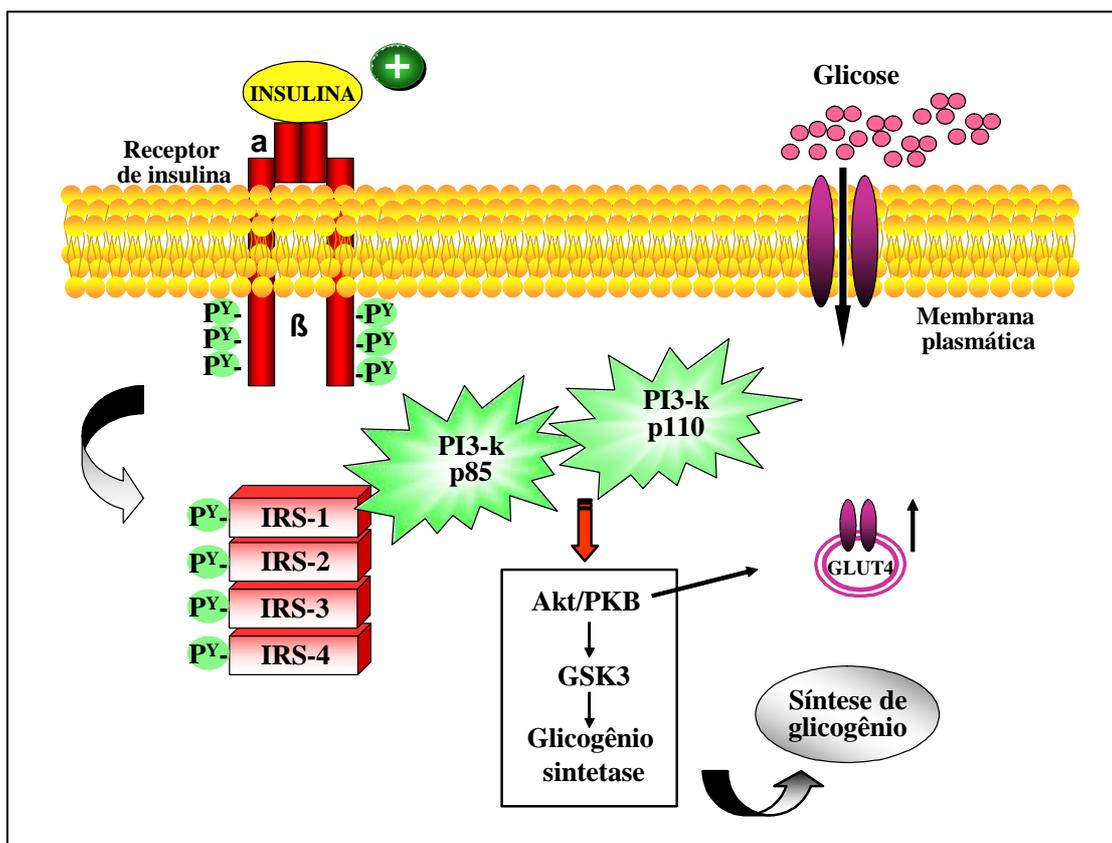


Figura 1 – Transdução do sinal da ação da insulina (Adaptado de Saltiel & Kahn 2001).

Estudos realizados com agentes farmacológicos ou com animais geneticamente modificados têm mostrado que alterações nessas etapas iniciais da via de sinalização da insulina promovem resistência a esse hormônio (18,19,20,21,22). A resistência à insulina é uma condição na qual concentração fisiológica de insulina provoca resposta

subnormal dos tecidos alvo. No tecido muscular e adiposo ocorre menor captação e no fígado maior produção de glicose. Em consequência, ocorrem hiperglicemia e aumento da secreção de insulina pelo pâncreas, na tentativa de manter a normoglicemia. Assim, a resistência à insulina é acompanhada por hiperinsulinemia (2,9,23), uma condição genética ou adquirida.

Um conjunto crescente de evidências tem sustentado a hipótese de que condições nutricionais desfavoráveis, em fases críticas do desenvolvimento (vida intra-uterina e neonatal), predis põe a doenças como diabetes tipo 2 e síndrome de resistência à insulina na maturidade (24). De acordo com essa hipótese, denominada “hipótese de Barker” ou “hipótese do fenótipo econômico”, a desnutrição intra-uterina e na lactação produz alterações irreversíveis na estrutura e função do pâncreas e dos chamados sítios de ação da insulina (fígado, tecido muscular e tecido adiposo). A restrição protéica altera a expressão de genes e a atividade de enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo da glicose. A atividade da glicoquinase está diminuída e a da fosfoenolpiruvato carboxiquinase está aumentada e estas alterações são acompanhadas por mudanças paralelas nos níveis do RNA mensageiros dessas enzimas no fígado (25,26). A regulação hormonal da produção de glicose hepática também está alterada nesse modelo animal. Em ratos adultos recuperados da desnutrição intra-uterina e neonatal, a insulina é incapaz de inibir a produção da glicose hepática estimulada pelo glucagon e ao mesmo tempo esses animais apresentam resistência a este hormônio (27). Todas essas alterações sinalizam para aumento da síntese, ao invés da utilização da glicose pelo fígado.

No tecido muscular esquelético, a desnutrição intra-uterina e pós-natal não altera o tipo e o arranjo de fibras musculares, mas reduz o tamanho dessas fibras. A quantidade de IR, a fosforilação do IRS-1, a associação do IRS-1 a PI3-quinase estão

aumentadas, mas quantidade total de GLUT4 (transportador de glicose 4) não está modificada, embora seja observada uma maior proporção desse transportador na membrana plasmática de músculo de ratos recuperados da desnutrição intra-uterina e pós-natal do que em controles. Essas modificações foram associadas a uma maior captação de glicose estimulada por insulina, indicando aumento da sensibilidade do tecido muscular esquelético à insulina (28,29).

Adipócitos isolados de ratos submetidos à restrição protéica em fases iniciais da vida, apresentam aumento da concentração de IR, da atividade da PI3-quinase associada ao IRS-1, e da atividade da proteína quinase B (PKB/Akt) (30,31,32). Essas alterações são acompanhadas por aumento da captação de glicose, na presença de baixa e de alta concentração de insulina (30,33). A capacidade da insulina de suprimir a taxa de lipólise estimulada por isoprenalina está inibida (32), provavelmente, devido à insensibilidade ao hormônio em concentração fisiológica (33). Os adipócitos desses animais têm concentrações relativamente baixas da subunidade catalítica p110 β da PI3-quinase sem alteração da subunidade p110 α (32). Esse estudo sugeriu que as diferentes respostas sobre a captação de glicose e lipólise podem estar refletindo a ativação seletiva das isoformas da subunidade catalítica da PI 3-quinase.

Assim, a restrição protéica em fases iniciais da vida produz efeitos distintos sobre o metabolismo da glicose e ação da insulina, incluindo alterações na regulação da produção de glicose hepática e na supressão da lipólise no tecido adiposo, situações essas que são consistentes com o estado de resistência à insulina.

Intervenções dietéticas têm se mostrado úteis no tratamento e na prevenção de doenças crônicas, como o diabetes tipo 2, e a soja (*Glycine max*) tem sido associada a esses benefícios (34).

A soja surgiu como importante nutriente em meados do primeiro milênio e tem sido cultivada na China há séculos, por mais de 5000 anos. O valor nutritivo da soja varia de acordo com a composição de suas partes, onde 8% de seu peso correspondem à casca, sendo o restante composto por 40,2% de proteínas, 21,0% de lipídeos, 33,9% de carboidratos, 6 a 7% de fibras e 4,9% de cinzas. Observa-se que a proteína de soja contém maiores quantidades dos aminoácidos arginina e glicina, porém é deficiente em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) quando comparada à proteína animal (35).

Atualmente, a soja apresenta um grande potencial no mercado de alimentos funcionais, devido à presença de compostos bioativos, como as isoflavonas, as quais têm sido largamente estudadas quanto aos seus efeitos biológicos benéficos à saúde humana. As isoflavonas estão amplamente distribuídas no reino vegetal, principalmente na soja, e seus derivados são a genistina, daidzina e a gliciteína, os quais se apresentam como várias formas de conjugados glicosídicos, dependendo da extensão do processamento ou fermentação (36). Uma vez ingeridas, estas são hidrolisadas por β -glicosidases produzidas por bactérias intestinais, sendo convertidas para a forma “agliconas bioativas” correspondentes (genisteína, daidzeína e gliciteína) (37).

A genisteína, uma das principais isoflavonas bioativas encontrada na soja, afeta favoravelmente a homeostase glicêmica por seus efeitos sobre a secreção de insulina, adipócitos e músculo esquelético (38,39,40,41). Evidências experimentais sugerem que a genisteína tenha papel na regulação da secreção de insulina, por competir com os sítios de ligação do ATP das proteínas tirosina-quinase, inibindo-as. Entretanto, outros estudos têm sugerido que o efeito estimulatório da genisteína sobre a secreção de insulina, pode ocorrer independentemente da inibição da atividade de proteínas tirosina-quinase e resultaria do aumento da concentração de AMPc (38,42,43).

Em adipócitos, a genisteína inibe certas respostas à insulina (a oxidação da glicose estimulada por insulina e o efeito antilipolítico da insulina na presença de isoproterenol) sem bloquear a autofosforilação do IR ou fosforilação do IRS-1 e IRS-2 e não tem efeito sobre a atividade da piruvato desidrogenase e glicogênio sintase estimulada por insulina. Isso indica, que no adipócito, o efeito da genisteína sobre a transdução do sinal hormonal não resulta da inibição da atividade da tirosina-quinase (40).

No fígado, a genisteína reduz a incorporação da [¹⁴C] glicose em lipídeos e aumenta a liberação de ácidos graxos para o meio (44). No músculo esquelético a genisteína inibe a captação de glicose estimulada pela proteína desacopladora 3 (UCP3) (41).

A proteína da soja pode também aumentar a secreção de insulina e alterar a sensibilidade dos tecidos periféricos a esse hormônio. O aumento da secreção de insulina tem sido atribuído à composição de aminoácidos da sua proteína, especialmente às altas concentrações de arginina, um potente estimulador da secreção de insulina (45,46). A arginina exerce ação insulínica por seu acúmulo no interior das células β, que provoca a despolarização da membrana e a entrada de cálcio via canais de Ca²⁺ voltagem-dependentes (47). O Ca²⁺, principalmente o extracelular, tem um papel crucial na regulação da secreção da insulina pelas células β pancreáticas, uma vez que, sua retirada do meio inibe a secreção (48).

Acredita-se que os aminoácidos componentes da proteína da soja produzem um aumento da sensibilidade à insulina e melhoram a tolerância à glicose, por modularem a captação de glicose pelo tecido muscular (49). Estudos têm mostrado que a composição de aminoácidos pode alterar o transporte de glicose em tecidos periféricos. Em humanos, a infusão de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina)

que são predominantemente metabolizados no músculo esquelético, inibe a captação de glicose mediada pela insulina (50). A quantidade de aminoácidos de cadeia ramificada é menor na proteína da soja em comparação à caseína (34,39).

Por seus efeitos benéficos sobre a secreção e ação da insulina, a soja tem sido recomendada como alternativa alimentar na prevenção e tratamento de desordens metabólicas.

II - JUSTIFICATIVA

A influência da inadequação nutricional sobre o crescimento e desenvolvimento fetal e neonatal e sua relação com o surgimento de doenças metabólicas (doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade) na vida adulta, têm merecido intensa investigação científica nas últimas décadas.

Nós últimos anos, um conjunto crescente de evidências tem sustentado a idéia de que, distúrbios ocorridos em períodos críticos de desenvolvimento fetal, podem determinar alterações permanentes ou de longo prazo na fisiologia ou morfologia de um determinado órgão (51). Presume-se que a desnutrição intra-uterina e durante o primeiro ano de vida produza mudanças morfológicas e funcionais no pâncreas, fígado, tecido muscular e tecido adiposo, que se traduzem em insulinopenia, secreção de insulina diminuída e resistência à insulina. O padrão de anormalidades metabólicas e funcionais depende da fase da vida em que a desnutrição ocorre, do tipo e da intensidade da carência nutricional (24). Assim, é de fundamental importância conhecer os nutrientes que poderiam alterar a fisiologia normal e determinar o surgimento de doenças na vida adulta e também identificar alternativas alimentares para a prevenção e/ou recuperação.

O grupo do Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos da UFMT, tem estudado a relação entre desnutrição intra-uterina e na lactação e diabetes mellitus tipo 2 na vida adulta. Quando recuperados com caseína, esses animais apresentam déficit de secreção de insulina, mas a homeostase da glicose é inalterada à custa da melhora da sensibilidade à insulina no tecido muscular (52). Curiosamente, a recuperação com farinha de soja, aumenta a concentração sérica de insulina, mas reduz consideravelmente o conteúdo de glicogênio hepático, indicando uma resistência hepática à insulina (53). Essa resistência à insulina poderia ser mediada, por pelo menos

um dos componentes da soja – a *genisteína* – por seu efeito inibidor da atividade tirosina quinase da via de sinalização da insulina.

III - OBJETIVOS

3.1 - Geral

- ✓ Avaliar o mecanismo de ação da insulina em tecido hepático de ratos adultos expostos à restrição protéica na vida intra-uterina e lactação, recuperados com dieta à base de farinha integral de soja micronizada inativa.

3.2 - Específicos

Avaliar os efeitos da dieta à base de farinha micronizada de soja em ratos adultos recuperados da desnutrição sobre:

- ✓ O crescimento somático;
- ✓ Concentrações séricas de albumina, glicose, triglicérides, insulina e glucagon;
- ✓ Razão insulina/glicose e insulina/glucagon;
- ✓ Reservas de glicogênio hepático;
- ✓ Tolerância à glicose e a resposta insulínica à glicose *in vivo* pelo teste de tolerância à glicose (GTT);
- ✓ A expressão protéica do receptor de insulina, do IRS-1, PI3-quinase (p85 e p110) e Akt no tecido hepático.
- ✓ A fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1, PI3-quinase (p85) bem como a interação dos IRS-1 com a PI3-quinase, e conseqüente ativação da Akt em tecido hepático.

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso.

4.1. Animais

Foram utilizadas ratas adultas virgens, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade Albinos, ordem Rodentia Mammalia, família Muridae), com 90 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso. As ratas foram mantidas com machos da mesma linhagem, por uma noite (4 fêmeas e 1 macho); em gaiolas coletivas de polipropileno, medindo 37,0 x 31,0 x 16,0 cm, com tampa de material galvanizado. A prenhez foi confirmada pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal.

As fêmeas prenhes foram aleatoriamente divididas em 2 grupos: controle e desnutrido e receberam dietas isocalóricas à base de caseína com 17% de proteína (normoprotéica) e 6% de proteína (hipoprotéica) respectivamente, durante a prenhez e lactação. Após o nascimento, verificou-se o número de crias, o sexo e o peso corporal. No terceiro dia de vida, as ninhadas foram reduzidas a 8 filhotes, com a finalidade de padronizar as condições experimentais.

O desmame aconteceu aos 28 dias de vida e os machos recém desmamados foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos, e mantidos por 60 dias com as seguintes dietas:

- ✓ Grupo Controle (CC): prole de mães alimentadas com dieta normoprotéica durante a prenhez e a lactação e subsequentemente alimentada com a mesma dieta após o desmame.

- ✓ Grupo Controle-Soja (CS): prole de mães alimentadas com dieta normoprotéica durante a prenhez e a lactação e alimentada com dieta à base de farinha integral de soja micronizada inativa com 17% de proteína, após o desmame.
- ✓ Grupo Recuperado com Caseína (RC): prole de mães alimentadas com dieta hipoprotéica durante a prenhez e a lactação, e recuperada com dieta normoprotéica à base de caseína após o desmame.
- ✓ Grupo Recuperado com Soja (RS): prole de mães alimentadas com dieta hipoprotéica durante a prenhez e a lactação, e recuperada com dieta normoprotéica à base de farinha integral de soja micronizada inativa após o desmame.
- ✓ Grupo Hipoprotéico (HP): prole de mães alimentadas com dieta hipoprotéica durante a prenhez e a lactação, e mantida com a mesma dieta após o desmame.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos sob condições controladas de umidade, temperatura (24°C - 26°C), e ciclo de luz claro/escuro (12h/12h), tendo livre acesso à água e as respectivas dietas *ad libitum*.

Todos os experimentos foram dirigidos por princípios de boas práticas de laboratório e procedimentos científicos, seguindo o guia prático do manual de biotério do *International Committee on Laboratory Animals (ICLA)* (54).

4.2. Dietas

As dietas cujas composições encontram-se descritas no Quadro1, foram utilizadas nas fases de prenhez, lactação e recuperação e foram preparadas no Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos.

O grupo controle (primeira fase) e CC e RC (segunda fase) receberam dieta à base de caseína, contendo 17% de proteína, adequada para alimentação de roedores nas

fases de crescimento, prenhez e lactação, segundo as recomendações da AIN-93G (*American Institute of Nutrition*).

O grupo hipoprotéico foi alimentado com dieta hipoprotéica (6% de proteína), que teve a caseína substituída por carboidratos, sendo mantidas as proporções de amido, amido dextrinizado e sacarose, bem como a de L-cistina em relação ao teor de caseína, e as concentrações dos demais nutrientes.

A dieta à base de farinha integral de soja micronizada inativa seguiu as recomendações da AIN-93G, sendo a caseína, o óleo de soja e fibra, substituídos pela farinha integral de soja, e mantido em 17% o teor de proteína da dieta. Foram realizados ajustes na dieta à base de farinha integral de soja para compensar o teor de hidratos de carbono, lipídios e fibras presentes na farinha.

A farinha integral de soja micronizada inativa é obtida por processamento industrial (tratamento térmico, descascamento, pré-moagem e micronização), que resulta na redução do sistema enzimático e fator anti-tripsina, atingindo 80% do valor nutricional da caseína animal. A composição centesimal e de aminoácidos da farinha integral de soja encontram-se descritas nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

Todas as dietas foram elaboradas na forma de pó, sendo os ingredientes secos pesados em balança analítica marca Marte, modelo A 500, com precisão de 0,01 g, peneirados (malha 200) e homogeneizados. As dietas foram preparadas em quantidade suficiente para todo o estudo, acondicionadas em recipientes de polipropileno, hermeticamente fechados e armazenadas a 5 °C.

Quadro 1 – Composição das dietas controle, hipoprotéica e à base de farinha de soja utilizadas na primeira e segunda fase experimental (g/Kg).

Ingredientes	Controle (17% proteína)	Hipoprotéica (6% proteína)	Farinha de soja (17% proteína)
Caseína (84% proteína)	202,0	71,5	-
Farinha Integral de soja	-	-	415,0
Amido de milho [§]	397,0	480,0	312,2
Amido de milho dextrinizado [§]	130,5	159,0	103,7
Sacarose	100,0	121,0	78,6
Óleo de soja	70,0	70,0	-
Fibras	50,0	50,0	40,0
Mistura mineral (AIN-93)G*	35,0	35,0	35,0
Mistura vitaminas (AIN-93)G*	10,0	10,0	10,0
L-cistina	3,0	1,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5

* Ver para mais detalhes (55) .

§ Corn Products do Brasil, São Paulo.

Quadro 2 – Composição nutricional da farinha integral de soja micronizada inativa em 100g.

Componentes	
Valor Calórico, kcal	455
Proteínas, g	41,00
Carboidratos, g	25,50
Gorduras totais, g	21,00
Fibra alimentar, g	2,00
Umidade, g	6,00
Cinzas, g	4,50
Isoflavonóides, mg	100,00

(DINAL 4.3260.0003.01-2) (56).

Quadro 3 – Composição de aminoácidos da farinha integral de soja micronizada inativa e da caseína.

Aminoácidos	% Aminoácidos	
	Farinha de Soja Inativa	Caseína
Lisina	2,55	6,82
Histidina	1,03	2,41
Arginina	3,22	3,28
Ácido aspártico	4,76	3,23
Treonina	1,62	3,12
Serina	2,26	4,30
Ácido glutâmico	7,60	15,90
Prolina	2,05	8,29
Glicina	1,66	1,35
Alanina	1,75	2,11
Cistina	0,39	0,40
Valina	1,75	3,94
Metionina	0,58	0,71
Isoleucina	1,69	2,90
Leucina	3,16	6,01
Tirosina	1,46	3,86
Fenilalanina	2,05	3,65
Triptofano	0,52	0,91

(DINAL 4.3260.0003.01-2) (56)

4.3. Procedimentos Experimentais

4.3.1. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (GTT)

Aos 90 dias de vida, após 15h de jejum, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (100mg/kg de peso corporal) e extremidade da cauda seccionada para a primeira coleta de sangue (tempo 0). Em seguida solução de glicose a 20% foi administrada intraperitonealmente, na dose de 2,0 g/kg por peso corporal glicose (200 g/l) e amostras de sangue foram coletadas nos tempos 30, 60 e 120 minutos para a determinação de concentrações séricas de glicose e de insulina. As respostas da glicose e da insulina durante o teste de tolerância à glicose foram avaliadas pela estimativa das áreas totais sob as curvas de glicose (ΔG) e de insulina (ΔI), usando o método do trapézio (57).

4.3.2. Amostras e Análises:

Um grupo de ratos foi anestesiado com tiopental sódico (100mg/kg peso corporal) e após laparotomia mediana, amostras de fígado foram rapidamente removidas para determinação do glicogênio (58,59), bem como para determinação da expressão das proteínas IR, IRS-1, PI3-quinase (p85 e p110) e Akt. Um segundo grupo de animais foi anestesiado e usado para determinar a ativação da sinalização induzida por insulina do IR, IRS-1, PI3-quinase e Akt. Em seguida, os ratos foram sacrificados por decapitação e amostras de sangue foram coletadas. O soro foi obtido por centrifugação e alíquotas foram usadas para dosagem das concentrações da insulina, glucagon, glicose, triglicérides e albumina.

4.3.3. Extração de tecidos “imunoblot” e imunoprecipitado

Para imunoblot: Após laparotomia mediana, um fragmento do fígado foi retirado e imediatamente homogeneizado em tampão de extração para extrato total [100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L SDS 10%, 100 mmol/L pirofosfato de sódio, 100 mmol/L fluoreto de sódio e 10 mmol/L ortovanadato de sódio] usando “Polytron”. O material insolúvel foi removido e centrifugado a 13.400G por 20 minutos a 4°C. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (60). Amostras contendo 125µg de proteína foram incubadas em tampão concentrado de Laemmli 4x e 15mg de DTT, e a corrida eletroforética, realizada em gel de policrilamida a 120 V por 30 minutos (gel a 6,5% para IRS-1, 8% para IR-β e PI3-K, a 10% para Akt). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) por 90 minutos a 120 V, em tampão contendo metanol e SDS. Para verificar a eficiência da transferência das proteínas, coramos membranas com Ponceau. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% com solução Tris-salina (10mmol Tris/l, 150 mmol NaCl/l, 0,5% Tween 20) por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente, as membranas foram lavadas com solução Tris-salina em três sessões de 10 minutos e incubadas com anticorpos específicos (IR-β, IRS-1, p85, p110 e Akt), sob agitação constante a 4°C “overnight”. Novamente as membranas foram lavadas com solução Tris-salina como descrito anteriormente e incubadas em solução contendo anticorpo secundário “anti-rabbit peroxidase” ou “anti goat peroxidase” (diluição 1/5000) e 3% de albumina, por duas horas em temperatura ambiente. A detecção das proteínas foi feita por quimiluminescência (Super Signal West Pico, Pierce). Para determinação da Akt fosforilada foi adotado o mesmo procedimento, após estímulo com insulina, como descrito a seguir.

Para imunoprecipitação: Para o estudo das etapas iniciais da ação insulínica, os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente e submetidos à extração do tecido após a confirmação da perda dos reflexos corneanos e caudal.

Para os animais que não receberam estímulo de insulina (grupo negativo), foram retirados fragmentos de fígado para processamento conforme descrito abaixo. Para os animais que receberam estímulo agudo de insulina (grupo positivo), foi injetada por via intraperitoneal, insulina regular em concentração de 1,5U/kg de peso e após 4 minutos foi retirado um fragmento do fígado. O material coletado foi imediatamente adicionado ao tampão de extração para imunoprecipitado [1% Triton X-100, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 100 mmol/L pirofosfato de sódio, 100 mmol/L fluoreto de sódio, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L ortovanadato de sódio, 2.0 mmol/L PMSF, e 0.1 mg aprotinina/ml] e homogeneizado durante 20 segundos, a 4°C usando “Polytron”. Foi adicionado ao homogeneizado, Triton 10% (200µl) e após 1 h as amostras foram centrifugadas a 13.400G por 20 minutos a 4°C. O “pellet” foi desprezado e alíquotas do sobrenadante foram usadas para medida da concentração protéica (60). As amostras contendo 125µg de proteína foram incubadas com anticorpos anti-IR-β, anti-IRS-1 “overnight” a 4°C, sob agitação constante. No dia seguinte, foi adicionado às amostras Proteína A Sefarose (30 µl), sendo estas mantidas sob agitação constante a 4°C por 2 horas. O “pellet” foi lavado com solução tampão [0,5% Triton X-100, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 10 mmol/L EDTA e 10 mmol/L ortovanadato de sódio] (3 x por 5 min), ressuspenso com 20 µl de tampão de Laemmli e fervido por 5 minutos. A seguir, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para a membrana de nitrocelulose, conforme descrito anteriormente. As membranas foram blotadas com anticorpo antifosfotirosina para detecção do grau de fosforilação do IR-β, IRS-1 e anticorpo anti-PI3-K (p85) para avaliação da associação do IRS-1/PI3-K, “overnight” a 4°C, sob agitação constante. O

material foi novamente lavado com solução Tris-salina, em três sessões de dez minutos e incubado a seguir com anticorpo secundário peroxidase conjugada “anti-mouse” ou “anti-rabbit” – diluição 1/5000, por duas horas a temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas com solução Tris-salina e os anticorpos foram detectados usando kit de quimiluminescência conforme procedimento anterior.

A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autoradiografias, reveladas por densitometria ótica, utilizando um scanner (Epson Stylus CX 3500) e o programa Scion Image (Scion Corporation). Os dados numéricos obtidos, correspondentes às bandas protéicas, foram comparados estatisticamente como descritos em análises estatísticas (item 4.4).

4.3.4. Determinações Bioquímicas

4.3.4.1. Albumina

Foi determinada pelo método colorimétrico do verde de bromocresol (61). Foram adicionados 0,01 ml de soro, 1ml do reativo de cor. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 500 nm.

4.3.4.2. Glicose

Foi determinada utilizando um monitor com tiras de teste para determinação da glicemia (glicosímetro) por fotômetro de refletância da marca Accu-chek Active, laboratório Roche Diagnósticos do Brasil.

4.3.4.3. Triglicérides

Foi determinada por método enzimático usando espectrofotômetro (BT-3000 Plus, Wiener Lab, Rosario, Argentina). Os valores foram expressos em mmol/L.

4.3.4.4. Glicogênio Hepático

Para a dosagem do conteúdo de glicogênio hepático, coletaram-se amostras entre 0,3g a 0,5g do tecido, que foram imediatamente transferidas para tubos de centrifuga graduados, contendo 2ml de KOH a 30%. Os tubos foram cobertos com bola de vidro e mantidos em banho-maria a temperatura de 100°C durante 1 hora, para digestão do tecido.

Posteriormente procedeu-se a extração alcoólica do glicogênio, mediante a adição de 4,5ml de álcool etílico absoluto. A seguir, colocou-se esta mistura em banho-maria por cerca de 15 segundos até o álcool começar a levantar fervura. Procedeu-se o resfriamento para posterior centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, adicionado 2ml de água destilada quente, para levantar o precipitado, que em seguida foi agitado e acrescentado novamente 4,5ml de álcool etílico absoluto. O procedimento anterior foi repetido. O precipitado foi diluído em 25ml de água destilada. A determinação do conteúdo de glicogênio foi realizada com reagente de fenol a 2% em ácido sulfúrico, para hidrólise ácida do polímero, segundo método colorimétrico de Hassid & Abrahams (58). As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 490 nm.

Tomando-se como referência uma curva padrão de glicose, determinou-se o teor de glicose obtido nas amostras. Calculou-se posteriormente, a concentração de glicogênio e os valores foram expressos em mg de glicogênio/100mg de peso fresco de tecido hepático.

4.3.4.5. Insulina

A concentração de insulina sérica foi determinada por radioimunoensaio, de acordo com o método descrito por Scott et al. (62). Foram transferidas alíquotas de 0,1

ml das amostras desconhecidas (em duplicata) as quais receberam, a seguir, 0,2 ml de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com ^{125}I (traçador) em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl 0,9% e albumina 0,5%. Em seguida foram preparados os seguintes controles:

a) Três tubos (Totais) que receberam somente 0,2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I para averiguação da radiação máxima.

b) Três tubos (Ligação não específica) contendo 0,2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e 0,1 ml de tampão fosfato, para determinar possíveis interferências no ensaio pelos componentes do tampão.

c) Três tubos (Referência) contendo 0,2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada com ^{125}I e anticorpo anti-insulina e 0,1 ml de tampão fosfato, constituindo assim o zero de insulina da curva padrão.

Em seguida, preparou-se também em triplicata, uma série de tubos (curva padrão), contendo 0,1 ml de insulina conhecida nas seguintes concentrações: 0,02; 0,039; 0,078; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; e 5,0 ng/ml. Cada tubo dessa série recebeu também 0,2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e anticorpo anti-insulina. Em seguida, amostras, controle e curva padrão foram agitados em vórtex e estocados a 4 °C, durante 48 horas. Após este período de incubação, com exceção dos totais para análise da radiação máxima, todos os outros tubos receberam 0,2 ml de uma solução contendo 2,5% de carvão (Norit A), 0,5% de albumina e 0,25% de dextran T 70. Os tubos foram deixados em repouso durante 20 min e a seguir centrifugados durante 20 min (800 G) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo avaliada em contador de radiação gama. Os três tubos elaborados para análise da radiação máxima não tiveram o sobrenadante descartado, sendo as radiações dos mesmos avaliadas diretamente. Com bases nos valores obtidos nos tubos contendo insulina

conhecida elaborou-se curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores desconhecidos das amostras. Os resultados foram expressos em pmol/L.

4.3.4.6. Glucagon

A concentração de sérica basal de Glucagon das amostras de soro dos animais foi dosada utilizando-se o kit comercial de ELISA – Rat Glucagon Elisa Kit Waco, segundo a indicação do fabricante (Waco Pure Chemical Industries, Ltd., Japan). Os resultados foram expressos em pmol/L.

4.4. Análises estatísticas

Os resultados são apresentados em média e erro padrão da média, com o número de animais indicados entre parênteses.

Ao comparar os grupos CC, CS, RC e RS, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) a dois fatores (estado nutricional e dieta). Os mesmos dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) a um fator, comparando os grupos RC, RS e HP para verificar se as dietas utilizadas foram capazes de promover a recuperação nutricional. Quando necessário essas análises foram complementadas por testes de comparações múltiplas de médias (LSD).

Todas essas análises foram precedidas do teste de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias. Os resultados com variâncias heterogêneas e sem distribuição normal foram inicialmente transformados (logarítmica – Log_{10} ou Ln da variável) para correção da heterogeneidade ou anormalidade (63).

Em todos os casos estabeleceu-se um nível de significância para a rejeição da hipótese de nulidade de 5% ($p < 0,05$)

Para análise dos resultados utilizou-se o programa “Statistica for Windows”, versão 4.3, 1993 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

VI - RESULTADOS

No início da fase de recuperação, o peso corporal dos ratos RC ($24,3 \pm 5,5$ g, n= 12), RS ($23,2 \pm 2,9$ g, n= 12) e do HP ($28,6 \pm 3,2$ g, n= 13) foi similar entre os grupos e significativamente menores do que os ratos CC ($78.6 \pm 13,5$ g, n= 10) e CS ($70,7 \pm 11,6$ g, n= 10).

O peso corporal, no final do período experimental, foi significativamente influenciado pelo estado nutricional antes da fase de recuperação ($F_{1,40} = 149,91$, $P < 0,001$) e pela dieta utilizada durante a recuperação ($F_{1,40} = 71,41$, $P < 0,001$), mas não houve interação entre estes dois fatores. Portanto, o peso corporal final dos ratos recuperados (RS: 263 ± 13 g, n= 12 e RC: 333 ± 23 g, n= 12) foi menor do que ratos controles (CS: 364 ± 20 g, n=11 e CC: 434 ± 53 g, n= 10). Embora os ratos RS tivessem o peso corporal final menor do que ratos RC, esse peso corporal foi maior do que os ratos HP (154 ± 34 g, n= 13; $P < 0,001$). A concentração sérica de albumina não diferiu entre os grupos de ratos controles e recuperados, mas quando avaliamos a recuperação nutricional, os ratos RC e RS exibiram maior concentração sérica de albumina do que os animais HP (CC: 31 ± 1 g/L, n= 6; CS: 31 ± 2 g/L, n=7; LC: 32 ± 1 g/L, n= 11; LS: 32 ± 2 g/L, n= 7; LL: 28 ± 3 g/L, n= 6).

A ANOVA duas vias revelou que a concentração sérica de triglicérides foi influenciada pelo estado nutricional prévio ($F_{1,20} = 5,41$, $P < 0,05$), pela dieta utilizada após o desmame ($F_{1,20} = 6,09$, $P < 0,05$) e pela interação entre esses dois fatores ($F_{1,20} = 5,41$, $P < 0,05$). Assim, grupos RS, CS e CC apresentaram concentrações similares entre si e menores do que o grupo RC. Concentração sérica de triglicérides do grupo HP não foi diferente da observada nos grupos RC e RS (tabela 1).

A glicemia basal não foi significativamente influenciada pelo estado nutricional prévio, pela dieta utilizada após desmame ou pela interação entre esses fatores. A

concentração sérica de insulina foi afetada pelo estado nutricional prévio ($F_{1,26}= 4,95$, $P<0,05$) e pela dieta utilizada após o desmame ($F_{1,26}= 6,18$, $P<0,02$), isto é, ratos recuperados (RC e RS) tiveram menor insulinemia do que os controles (CC e CS), enquanto os ratos mantidos com dieta à base de soja (CS e RS) tiveram maior insulinemia que aqueles alimentados com dieta à base de caseína (CC e RC). Conseqüentemente, a razão insulina/glicose foi menor nos ratos recuperados em relação aos ratos controles ($F_{1,26}= 7,83$, $P<0,01$) e maior nos ratos alimentados com dieta de soja em relação aos mantidos com caseína ($F_{1,26}= 8,05$, $P<0,01$). Quando avaliamos isoladamente a recuperação nutricional, observamos que a glicemia foi similar entre os grupos RC, RS e HP, e a insulinemia foi maior no grupo RS em comparação aos RC e HP. Conseqüentemente razão insulina/glicose foi maior nos ratos RS do que nos ratos RC e HP. Concentrações basais de glucagon foram similares entre os grupos. Entretanto, a razão insulina/glucagon foi maior no grupo RS do que nos grupos RC e HP (Tabela 1).

A média da área total sob a curva de glicose (ΔG), em resposta à carga de glicose, foi afetada pela interação do estado nutricional prévio e dieta ($F_{1,21}= 5,44$, $P<0,05$), e assim ΔG do grupo RC foi menor do que no grupo CC, mas similar entre os grupos RS e CS. A média da área total sob a curva de insulina (ΔI) e a razão $\Delta I:\Delta G$ foi significativamente afetada pela dieta utilizada durante a recuperação ($F_{1,21}= 10,7$, $P<0,01$ e $F_{1,21}= 10,23$, $P<0,01$, respectivamente). Ratos alimentados com dieta de farinha de soja tiveram maior ΔI e razão $\Delta I:\Delta G$ do que ratos alimentados com dieta à base de caseína. Após a recuperação nutricional, a média da área total sob a curva de insulina (ΔI) e razão $\Delta I:\Delta G$ do grupo RS foi maior do que o grupo RC e ambos tiveram essas variáveis maiores do que grupo HP ($P<0,01$). A curva ΔG em resposta à carga de glicose, não foi significativamente diferente entre os grupos RC, RS e HP (Tabela 1).

A concentração de glicogênio hepático foi afetada somente pela dieta utilizada após o desmame ($F_{1,35} = 5,48$, $P < 0,05$). Ratos mantidos com dieta à base de farinha de soja (CS e RS) tiveram menor conteúdo de glicogênio do que aqueles mantidos com dieta à base de caseína após o desmame (CC e RC). A avaliação da recuperação nutricional mostrou que ratos recuperados (RS e RC) tiveram menor conteúdo de glicogênio hepático do que os ratos HP ($P < 0,001$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Características metabólicas e hormonais de ratos adultos mantidos com dieta à base de caseína (CC e RC), farinha integral de soja (CS e RS) e dieta hipoprotéica (HP) após o desmame.

Variáveis	Grupos				
	CC	CS	RC	RS	HP
Triglicérides séricos (mmol/L)	0,6±0,15 ^B (5)	0,6±0,05 ^B (5)	1,2±0,2 ^{Aa} (7)	0,6±0,04 ^{Bb} (7)	1,0±0,2 ^{ab} (6)
Glicose sérica basal (mmol/L)	5,3±0,4 (6)	5,2±0,4 (6)	5,6±0,2 (9)	5,5±0,2 (9)	6,1±0,1 (5)
Insulina sérica basal (pmol/L)	266±48 (6)	305±55 (6)	157±19 ^b (9)	275±21 ^a (9)	132±8 ^b (5)
Razão insulina/glicose	49±6 (6)	61±12 (6)	28±3 ^b (9)	50±4 ^a (9)	21±2 ^b (5)
Glucagon sérico (pmol/L)	176±39 (6)	175±55 (6)	140±22 (9)	138±18 (7)	132±34 (5)
Razão insulina/glucagon	1,97±0,58 (6)	2,85±1,22 (6)	1,27±0,21 ^b (9)	2,28±0,31 ^a (7)	1,25±0,37 ^b (5)
ΔG (mmol/L.120min)	20002±712 ^A (6)	18669±445 ^{AB} (5)	17753±592 ^B (7)	18960±520 ^{AB} (7)	18151±780 (9)
ΔI (pmol/L.120min)	116±8 (6)	232±83 (5)	103±15 ^b (7)	203±30 ^a (7)	58±6 ^c (9)
$\Delta I/\Delta G$	19±2 (6)	40±14 (5)	19±2 ^b (7)	35±5 ^a (7)	10±1 ^c (9)
Glicogênio hepático (mg/100mg)	1,22±0,22 (9)	0,80±0,22 (10)	1,01±0,18 ^b (11)	0,61±0,06 ^b (9)	3,81±0,39 ^a (10)

Valores em média ± erro padrão da média com número de ratos em parênteses. Médias com diferentes letras minúsculas indicam diferenças, segundo ANOVA a um fator seguido do teste LSD. Médias com diferentes letras maiúsculas indicam diferenças, segundo ANOVA a dois fatores seguidos, de teste LSD.

A figura 2A mostra os níveis de expressão protéica do receptor de insulina (IR) no tecido hepático. Essa expressão foi afetada pelo estado nutricional prévio ($F_{1,8}= 7,28$, $P<0,05$) e pela dieta utilizada após o desmame ($F_{1,8}= 18,32$, $P<0,01$), mas não houve interação entre esses dois fatores ($F_{1,8}= 0,65$, $P>0,05$). Ratos recuperados (RC e RS) mostraram menor expressão do IR do que os ratos controles (CS e CC) enquanto os animais alimentados com dieta à base de soja (CS e RS) exibiram menor expressão da proteína quando comparados com aqueles mantidos com dieta à base de caseína (RC e CC). Entre os ratos recuperados (RS e RC) os níveis de IR foram similares e menores do que ratos HP.

O estado nutricional prévio e a dieta utilizada após o desmame, afetaram o nível protéico do IRS-1 hepático ($F_{1,8}= 10,24$, $P<0,05$ e $F_{1,8}= 7,6$, $P<0,05$, respectivamente). Assim, ratos recuperados (RC e RS) tiveram níveis reduzidos de IRS-1 quando comparados com ratos controles (CC e CS). Essa expressão foi diminuída pela dieta à base de soja independentemente do estado nutricional prévio. Nenhuma diferença foi verificada nos níveis IRS-1 quando foram comparados os grupos RS, RC e HP (Figura 2B).

A expressão protéica da subunidade p85 da enzima PI3-quinase, não foi afetada pelo estado nutricional prévio e nem pela dieta, observou-se, no entanto que houve interação entre esses fatores ($F_{1,8}= 17,07$, $P<0,01$). Nos ratos do grupo RS, os níveis de p85 foram mais elevados do que nos ratos do grupo RC, enquanto nos ratos CS a sua expressão foi menor do que nos ratos CC. Nenhuma diferença foi verificada entre ratos RS e CS como também entre os grupos HP, RS e RC (Figura 2C).

Em contraste ao descrito acima, o estado nutricional prévio e a interação entre estado nutricional e dieta influenciaram os níveis da subunidade p110 da enzima PI3-quinase ($F_{1,8}= 11,51$, $P<0,01$ e $F_{1,8}= 15,12$, $P<0,01$, respectivamente). Sua expressão foi

similar nos grupos RS e RC e menor no CS em relação ao grupo CC. Entre os grupos RS, RC e HP a expressão da p110 foi similar (Figura 2D).

Quanto à expressão protéica da Akt, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CC, CS, RC e RS, assim como entre os grupos HP, RS e RC (Figura 2E).

Após a administração da insulina, o incremento da fosforilação em tirosina do IR foi significativamente menor nos grupos recuperados (RS e RC) em comparação aos controles (CS e CC) ($F_{1,11} = 6,62$, $P < 0,05$), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos RS, RC e HP (Figura 3A). O incremento da fosforilação do IRS-1 e a associação do IRS-1/PI-3 quinase foram afetadas significativamente pelo estado nutricional prévio ($F_{1,8} = 14,14$, $P < 0,01$ e $F_{1,8} = 238,05$, $P < 0,001$, respectivamente), dieta ($F_{1,8} = 15,59$, $P < 0,01$ e $F_{1,8} = 251,88$, $P < 0,001$, respectivamente) e pela interação entre esses fatores ($F_{1,8} = 10,16$, $P < 0,02$ e $F_{1,8} = 1165,85$ $P < 0,001$ respectivamente). A magnitude do incremento da fosforilação do IRS-1 foi similar nos grupos RS e RC, e significativamente menor no grupo CS em relação ao CC. A fosforilação do IRS-1 foi maior nos ratos RS e RC, do que nos ratos HP (Figura 3B). Uma menor associação do IRS-1-p85/PI3-quinase estimulada pela insulina foi detectada no fígado de RS em relação aos ratos RC, e nos CS comparados com ratos CC. Além disso, os ratos RS exibiram menor associação do que os ratos HP e RC (Figura 3C).

Após administração da insulina, não houve incremento da fosforilação da Akt no grupo CS e houve redução na fosforilação do grupo RS ($F_{1,8} = 13,49$, $P < 0,01$). Nos ratos HP o estímulo da insulina produziu redução da fosforilação mais intensa em relação ao grupo RS (Figura 3D).

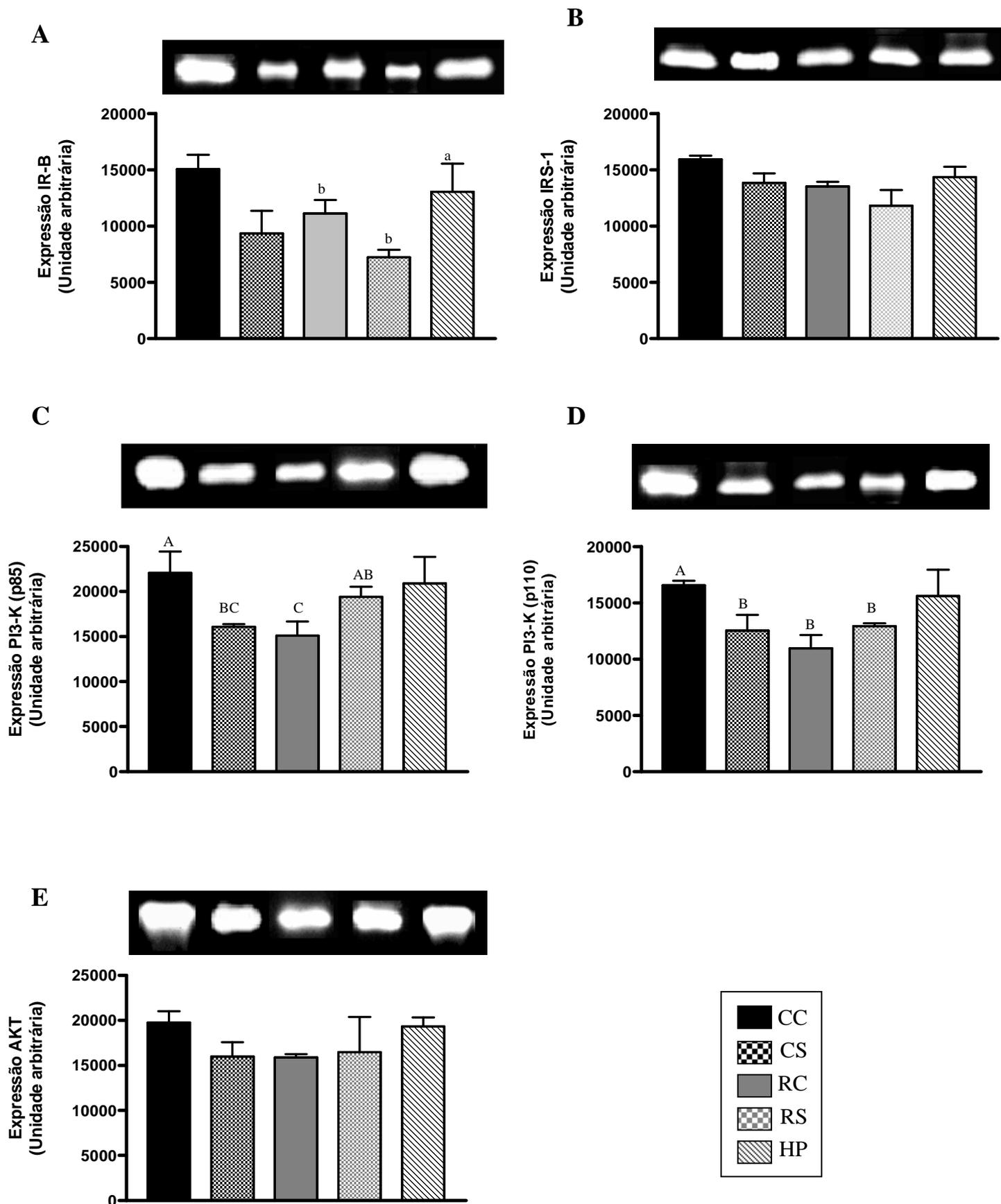


Figura 2 - Representação por “immunoblot” da expressão protéica do IR (A), IRS-1 (B), p85 (C), p110 (D) e Akt (E), no fígado de ratos adultos mantidos com dieta controle (grupos CC e RC), farinha de soja (grupos CS e RS) e hipoprotéica (grupo HP).

Valores representam média \pm erro padrão da média ($n=3$). Médias com diferentes letras maiúsculas indicam diferenças segundo ANOVA a dois fatores seguidos de teste LSD ($p<0,05$).

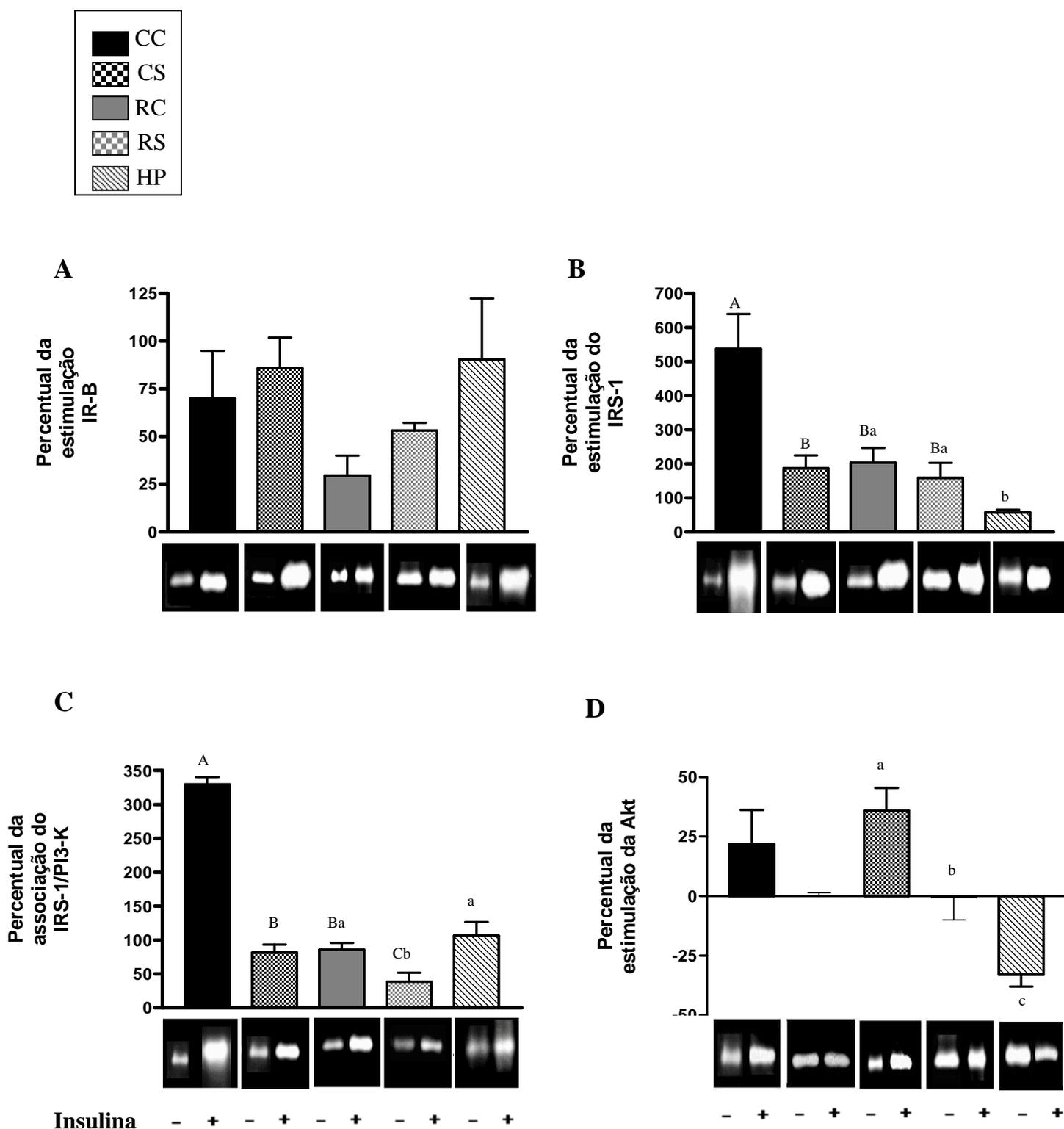


Figura 3 - Representação por “immunoblot” mostrando o percentual de aumento da estimulação da autofosforilação do IR (A), IRS-1 (B), a associação do IRS-1/PI3-kinase (p85) (C) e fosforilação da Akt (D), no fígado de ratos adultos mantidos com dieta controle (grupos CC e RC), farinha de soja (grupos CS e RS) e hipoprotéica (grupo HP).

Valores representam média \pm erro padrão da média ($n=3$). Médias com diferentes letras maiúsculas indicam diferenças segundo ANOVA a dois fatores seguidos de teste LSD. Médias com diferentes letras minúsculas indicam diferenças segundo ANOVA a um fator seguido de teste LSD ($p<0,05$).

VII – DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos os efeitos da recuperação nutricional com dieta à base de soja, na via de transdução do sinal da insulina no fígado de animais submetidos à restrição protéica na vida intra-uterina. A dieta à base de soja (grupos CS e RS) foi extremamente efetiva em inibir a expressão protéica do IR e IRS-1 no fígado. Embora evidências experimentais tenham sugerido que a genisteína da soja exerça efeitos biológicos benéficos através da inibição da atividade da proteína tirosina quinase (64,65), no presente estudo, a dieta de soja reduziu somente a fosforilação do IRS-1 após estímulo com insulina e apenas no grupo CS em relação ao grupo CC. Neste caso, a redução da proteína IRS-1 poderia ter um papel na diminuição da fosforilação do IRS-1 estimulada pela insulina. Entretanto, a redução da fosforilação do IRS-1 no grupo CS foi maior do que a diminuição da expressão protéica do IRS-1. Animais recuperados (RS e RC) exibiram redução tanto da expressão como da fosforilação das proteínas IR e IRS-1. Neste contexto, a diminuição da fosforilação do IR e IRS-1 poderia ser uma questão de estequiometria. A menor concentração protéica do IR e IRS-1, resultaria em uma menor fosforilação do IR e conseqüentemente menor interação entre IR e IRS-1, que levaria então para uma menor fosforilação do IRS-1. Como conseqüência, animais mantidos com dieta à base de soja, tornaram-se resistentes à insulina, a julgar pela concentração sérica basal da insulina, ΔI após carga de glicose e razão $\Delta I/\Delta G$. Entretanto, não houve sinais clínicos e laboratoriais de diabetes e dislipidemia se considerarmos ΔG normal durante teste do GTT, concentrações séricas basais da glicose e triglicérides. Interessante ressaltar que, nossos animais mantidos com dieta à base de soja, exibiram um fenótipo similar aos ratos com mutações combinadas de IR/IRS-1^{+/-}, que mostraram retardo moderado do crescimento, normoglicemia e hiperinsulinemia

moderada e concentrações de ácidos graxos livres normais (66). Entretanto, animais recuperados (RC e RS), que também exibiram redução das expressões IR e IRS-1, mostraram baixas insulinemia basal e razão insulina/glucose (uma indicação de aumento da sensibilidade à insulina), e nenhuma alteração na ΔI e razão $\Delta I/\Delta G$ quando comparados com os ratos controles (CC e CS).

Em virtude das diferenças nos níveis de insulina circulante entre os ratos recuperados e animais mantidos com dieta à base de soja, parece que a resistência à insulina resulta de um aumento da secreção de insulina. Esta suposição é reforçada por estudos que demonstram que um componente da soja, a genisteína, aumenta a secreção de insulina por sua capacidade de inibir a atividade tirosina quinase das células beta ou por ativar a via AMPc-PKA (38,65). Tem sido sugerido que o grau de compensação das células β correlaciona-se com o grau de resistência à insulina no tecido muscular e adiposo, mais do que com resistência hepática ao hormônio. A resposta pancreática é provocada, possivelmente por fatores secretados pelo tecido muscular e adiposo, ou por fatores portais que não estão presentes nos animais com resistência hepática à insulina (66). É interessante notar que ratos recuperados da desnutrição intra-uterina exibiram aumento da sensibilidade à insulina, como um resultado das alterações nas etapas iniciais da via de transdução do sinal do hormônio no músculo (52). Inversamente, tem sido mostrado que a genisteína inibe a captação de glicose no músculo esquelético (41) e reduz a deposição de gordura e o tamanho dos adipócitos (67) através da redução da lipogênese, induzida pela ação da insulina (39) e pelo aumento da lipólise induzida por epinefrina (68).

Classicamente, a supressão do IR no fígado tem sido associada à diminuição do conteúdo de glicogênio hepático (9,69). Em nosso estudo, embora ratos recuperados (RS e RC) e ratos mantidos com dieta à base de soja (CS e RS) tenham expressado

menor conteúdo de IR, apenas os últimos grupos exibiram redução do glicogênio hepático. A baixa concentração do glicogênio hepático observada em nossos animais alimentados com dieta à base de soja, não nos surpreendeu, pois, conforme descrito anteriormente por Keppens (70), hepatócitos frescos expostos à genisteína, ativou a enzima glicogênio fosforilase e inativou a glicogênio sintetase.

Geralmente observa-se um aumento da concentração sérica do glucagon em animais alimentados com dieta à base de proteína de soja (71,72) o que poderia explicar a depleção do glicogênio hepático, já que a sinalização do glucagon promove a glicogenólise e, algumas vezes, inibe a síntese de glicogênio no fígado (73). Entretanto, nossos animais alimentados com dieta à base de soja, não mostraram aumento da concentração sérica de glucagon. Nos ratos RS houve inclusive um aumento da razão insulina/glucagon, as custas do aumento da concentração sérica de insulina. Portanto, o aumento do glucagon não é uma explicação persuasiva para o baixo glicogênio hepático.

Visto que a insulina promove a ativação da Akt através da via PI3-quinase, conduzindo a várias conseqüências metabólicas, tais como a síntese de glicogênio (5,74), avaliamos a expressão protéica das subunidades regulatória e catalítica da enzima PI3-quinase (p85 e p110, respectivamente) e da Akt, como também, avaliamos a associação do IRS-1/p-85 da PI3-quinase e a fosforilação da Akt, após estímulo com insulina. Tem sido demonstrado que a redução da expressão da p85 melhora significativamente a sensibilidade à insulina (75) e o aumento pode resultar em resistência à insulina (76), pelo rompimento do balanço entre monômero livre p85 e o heterodímero p85-p110. O aumento ou a diminuição da expressão da p85 desloca este balanço a favor tanto da p85 livre, como o complexo p85-p110. Como o monômero e o heterodímero competem pelo mesmo sítio de ligação na proteína IRS, um desequilíbrio

poderia causar uma alteração da atividade da PI3-quinase (77). Em nosso estudo, ambas as expressões da p85 e p110 foram reduzidas no grupo CS em relação ao grupo CC, e essas mudanças não foram acompanhadas pelo aumento equivalente da sensibilidade à insulina. Inversamente, no grupo RS a expressão da p85 foi aumentada, mas a expressão da p110 foi inalterada em relação ao grupo RC, resultando em resistência à insulina no primeiro grupo em relação ao último. Em ambos os grupos CS e RS, houve diminuição da associação do IRS-1/ PI3-quinase. Assim, o desequilíbrio estequiométrico entre p85/p110 é um argumento plausível para explicar a resistência à insulina vista somente no grupo RS. No grupo CS, a redução da associação do IRS-1/PI3-quinase parece resultar dos baixos níveis de fosforilação do IRS-1.

A menor associação IRS-1/PI3-quinase após o estímulo com insulina, causou uma fosforilação da Akt diminuída no fígado de ratos alimentados com dieta à base de soja. No grupo HP, houve uma fosforilação reduzida em relação à condição não estimulada. Também, nenhuma alteração foi verificada na expressão da Akt em todos os grupos. O resultado observado no grupo HP vai ao encontro ao relatado por outros autores, que afirmam não haver necessariamente, correlação entre a quantidade de PI3-quinase recrutada e o grau de fosforilação da Akt (78).

Finalmente, os dados do presente estudo, sugerem que a dieta à base de soja, favorece o desenvolvimento da resistência à insulina, através de mecanismos celulares que variam em função do estado nutricional prévio. Em ratos recuperados, a dieta à base de soja, resultou em resistência à insulina no fígado, devido, pelo menos em parte, ao aumento da expressão da p85, que favoreceu a redução da associação do IRS-1/PI3-quinase. Em ratos controles, a resistência à insulina parece ter sido resultado da redução da fosforilação do IRS-1 que determinou menor associação do IRS-1 a PI3-quinase.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Haber RC, Curi R, Carvalho CRO, Carpinelli AR. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001; 45: 219-27.
2. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation.* 2000 Jul; 106.
3. Berne RM, Levy MN. *Fisiologia.* 4ª ed. Ed. Guanabara Koogan; 1998.
4. Boschero AC. Acoplamento da Estimulação-Secreção de insulina pelas Células β Pancreáticas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1996; 40: 149-55
5. Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M & Hellmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995 Dec; 378: 21-8.
6. Brady MJ, Nairn AC, Saltiel AR. The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. *J Biol Chem.* 1997; 272: 29698-703.
7. Zecchin HG; Carvalheira JBC, Saad MJA. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo* 2004; 4:574-89.
8. Carvalheira JB, Ribeiro EB, B. GR, Telles MM, Velloso LA, Gontijo JA, *et al.* Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats'. *Diabetes.* 2002; 51: A 41.
9. Biddinger S, Khan CR. From Mice to Men: Insight into the Insulin Resistance Syndromes. *Annu. Rev. Physiol.* 2006; 68:20.1–20.36

10. Kahn CR. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med.* 1985; 36: 429-51.
11. Backer JM, Myers MG Jr, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, *et al.* Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *Embo J.* 1992; 11:3469-79.
12. Stein, RC, Waterfield, MD. PI3-kinase inhibition: A targer for drug development? *Mol. Med. Today.* 2000; 6: 347-57.
13. Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3- kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 1999; 104: 733-41.
14. Saltiel A & Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001 Dec; 414: 799-806.
15. Saad MJA. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Braz J Med Biol Res.* 1994; 27: 941-57.
16. Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1999 Apr;103: 931-43.
17. Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR and Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet. Med.* 2005; 22: 674–82.
18. Carvalho CRO, Saad MJA. Resistência à insulina induzida por glicocorticóides: investigação de mecanismos moleculares. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1998; 42: 13-21.
19. Saad MJA, Hartmann LGG, Carvalho DS, Galoro CAO, Brenelli SL, Carvalho CRO. Effect of glucagon on insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation

- and association with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase). *FEBS Lett.* 1995; 370: 171-4.
20. Thirone ACP, Carvalho CRO, Brenelli SL, Velloso LA, Saad MJA. Chronic treatment with growth hormone modulates the early steps of insulin signal transduction in the liver and muscle rats. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 130: 33-42.
21. Saad MJA, Maeda L, Brenelli SL, Carvalho CRO, Paiva RS, Velloso LA. Defects in insulin's signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. *Diabetologia.* 1997; 40: 179-86.
22. Carvalho CRO, Brenelli SL, Silva AC, Nunes ALB, Velloso LA, Saad MJA. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *J Endocrinol.* 1996; 137: 151-9.
23. Cesaretti MLR, Junior OK. Modelos Experimentais de Resistência à Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas. *Arq Brás Endocrinol Metab.* 2006; 50: 190-7.
24. Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992; 35: 595-601.
25. Desai M.; Crowther N.J.; Ozanne S.E.; Lucas A.; Hales C.N. Adult glucose and lipid-metabolism may be programmed fetal life. *Biochemical Society Transactions.* 1995; 23: 331-5.
26. Desai M, Byrne CD, Zhang J, Petry CJ, Lucas A & Hales CN. Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rat dams fed an isocaloric protein-restricted diet. *Am. J. Physiol.* 1997; 35: G1083-90.
27. Ozanne SE, Smith GD, Tikerpae J, Hales CN. Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Am J Physiol.* 1996a; 270: E559-E64.

28. Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, Smith GD. Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am J Physiol.* 1996b; 271: E1128-34.
29. Latorraca MQ, Reis MA, Carneiro EM, Mello MA, Velloso LA, Saad MJ, *et al.* Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J Nutr.* 1998; 128: 1643-9.
30. Ozanne SE, Nave BT, Wang CL, Shepherd PR, Prins J, Smith GD. Poor fetal nutrition causes long-term changes in expression of insulin signaling components in adipocytes. *Am J Physiol.* 1997; 273: E46–E51
31. Shepherd PR, Crowther NJ, Desai M, Hales CN, Ozanne SE. Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br J Nutr.* 1997; 78: 121-9.
32. Ozanne SE, Wang CL, Dorling MW, Petry CJ. Dissection of the metabolic actions of insulin in adipocytes from early growth-retarded male rats. *J Endocrinol.* 1999; 162: 313-9.
33. Holness MJ, Fryer LGD, Sugden MC. Protein restriction during early development enhances insulin responsiveness but selectively impairs sensitivity to insulin at low concentrations in white adipose tissue during a later pregnancy. *Br J Nutr* 1996; 81: 481–89.
34. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *J Clin Nutrition.* 2002; 6: 1191-01.
35. Morais AAC, Silva AL. Soja e suas aplicações. 3^aed. Medsi Editora Médica e Científica Ltda: 2000a.
36. Esteves EA, Monteiro JBR. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. *Ver. Nutr.* 2001; 14: 43-52.

37. Anderson JJB, Garner SC. Phytoestrogens and human function. *Nutrition Today*. 1997; 32: 232-9.
38. Liu D, Zhen W, Yang Z, Carter JD, Si H, Reynolds KA. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic beta-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes*. 2006; 55: 1043-50.
39. Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000; 75: 265-71.
40. Abler A, Smith JA, Randazzo PA. Genistein differentially inhibits postreceptor effects of insulin in rat adipocytes without inhibiting the insulin receptor kinase. *J Biol Chem*. 1992; 267: 3946-51.
41. Huppertz C, Fischer BM, Kim YB. Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2001; 276: 2520-9.
42. Ohno T, Kato N, Ishii C, Shimizu M, Ito S, Tomono S, Kawazu S, *et al*. Genistein augments cyclic adenosine 3'5'-monophosphate (cAMP) accumulation and insulin release in MIN6 cells. *Endocrine Research*. 1993; 19: 273-85.
43. Jonas JC, Plant TD, Gilon P, Detimary P, Nenquin M, Henquin JC, *et al*. Multiple effects and stimulation of insulin secretion by the tyrosine kinase inhibitor genistein in normal mouse islets. *British J Pharmacol*. 1995; 114: 872-80.
44. Nogowski L, Mackowiak P, Kandulska K. Genistein-induced changes in lipid metabolism of ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab*. 1998; 42: 360-6.
45. Fajans SS, Floyd JC, Knof RF Jr, Conn FW. Effect of amino acids and proteins on insulin secretion in man. *Recent Prog Horm*. 1997; 23: 617-62.

46. Sanchez A & Hubbard RW. Plasma amino acids and the insulin/glucagon ratio as an explanation for the dietary protein modulation of atherosclerosis. *Med. Hypotheses*. 1991; 35: 324-9.
47. Blachier F, Mourtada A, Sener A, Malaisse WJ. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Uptake of metabolized and nonmetabolized cationic amino acids by pancreatic islets. *J Endocrinol*. 1989; 124: 134-41.
48. Grodsky GM, Bennett LL. Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. *Diabetes*. 1996; 15: 910-2.
49. Lavigne C, Marette A, Jacques H. Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 278: E491-E00.
50. Schwenk WF, Haymond MW. Effects of leucine, isoleucine, or threonine infusion on leucine metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1987; 253: E428-E34.
51. Miñana-Solis MC, Escobar C. Increased Susceptibility to Metabolic Alterations in Young Adult Females Exposed to Early Malnutrition. *Int. J. Biol. Sci*. 2007; 3: 12-9.
52. Latorraca MQ, Carneiro EM, Boschero AC, Mello MAR. Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. *Br J Nutr*. 1998; 80: 291-7.
53. Oliveira EA, Veloso VR, Arantes VC, Carneiro EM, Boschero AC, Latorraca MQ. Nutritional recovery with soybean flour diet improve the insulin response to glucose load without to modify glucose homeostase. *No prelo* 2007.
54. Manual para Técnicos em Laboratórios. Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), 2^a ed. 1996.

55. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey CG Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: reports of the American Institute of Nutrition ad hoc working committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123: 1939-51.
56. DINAL 4.3260.0003.01-2. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de alimentos/DINAL da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária.
57. Matthews JNS, Altman DG, Campbell MJ, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J.* 1990; 27: 230-5.
58. Hassid WZ, Abrahams S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. *Meth Enzymol.* 1957; 3: 34-6.
59. Sjörgreen B, Nordenskjold T, Holmgren H, Wollerstron J. Bertrag zur kemtmis des leberhythmic. *Pflügers Arch. Gesante Menschem Tierr.* 1938; 240-7.
60. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-54.
61. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and measurements of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta.* 1971; 31: 87-96.
62. Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia.* 1981; 21: 470-5.
63. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, W. H. Freeman and Company, New York. 1995; 392-50.
64. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, *et al.* Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 1987; 12: 5592-95.

65. Sorenson R, Brelje CT, Roth C. Effect of tyrosine kinase inhibitors on islets of Langerhans: evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion. *Endocrinol.* 1994; 4: 1975-8.
66. Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, Accili D. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 199-05.
67. Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, Helferich G, Cooke P. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *J Endocrinol.* 2003; 8: 3315-20.
68. Harmon AW, Harper JB. Differential effects of flavonoids on 3t3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280: C807-C13.
69. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR. Loss of Insulin Signaling in Hepatocytes Leads to Severe Insulin Resistance and Progressive Hepatic Dysfunction. *Molecular Cell.* 2000 Jul; 6: 87-7.
70. Keppens S. Effect of genistein on both basal and glucagon-induced levels of camp in rat hepatocytes. *Biochemical PhammcoIo_? y.* 1995; 50: 1303-4.
71. Torres N, Torre-Villalvazo I, Tovar AR. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J Nut Biochem.* 2006 Jun; 17: 365-73.
72. Tovar AR, Ascencio C, Torres N. Soy protein, casein and zein regulate histidinase gene expression by modulating serum glucagon. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 283:E1016-E22.
73. Jiang G, Zhang B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 284: E671-E8.

74. Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 1995; 376: 599-02.
75. Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, Minoura H, Murakami K, Okuno A, *et al*. Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nature genetics*. 1999 Feb; 21.
76. Barbour LA, Shao J, Gao L, Leitner W, Anderson M, Jacob E, Friedman JE, *et al*. Human Placental Growth Hormone Increases Expression of the P85 Regulatory Unit of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Triggers Severe Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *J Endocrinol*. 2004 Mar; 145: 1144-50.
77. Draznin Boris. Molecular mechanisms of insulin resistance: Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increase expression of p85 α . *Diabetes*. 2006; 55.
78. Fruman DA, Mauvais-Jarvis F, Pollard DA, Yballe CM, Brazil D, Bronson RT, *et al*. Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85. *Nature Genetics*. 2000; 26.

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](#)