

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITO DA RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL DE RATOS COM
DIETA À BASE DE SOJA SOBRE A SÍNTESE DE ÁCIDOS
GRAXOS HEPÁTICOS**

Sílvia Regina de Lima Reis

CUIABÁ, MT - 2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITO DA RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL DE RATOS COM
DIETA À BASE DE SOJA SOBRE A SÍNTESE DE ÁCIDOS
GRAXOS HEPÁTICOS**

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

Orientanda: Sílvia Regina de Lima Reis

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Márcia Queiroz Latorraca

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

CUIABÁ, MT - 2007

Dedicatória

Ao meu querido esposo André Reis, ao meu filho André Matheus e a minha filha Ana Júlia, que são minha fonte de inspiração e alegria na vida.... E por me apoiarem e compreenderem os meus momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meu caminho, pela minha serenidade e obstinação em tudo que me proponho a fazer em minha vida.

À minha mãe Cleuza da Silva de Lima, ao meu pai Sebastião de Lima, aos meus irmãos (Márcio, Marcos e Alex) e grupos de amigos (s) pelo incentivo, compreensão, apoio e por entenderem a minha ausência.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Queiroz Latorraca pela oportunidade, apoio, companheirismo, paciência, orientação, incentivo, dedicação, pela competência no desenvolvimento do trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e confiança depositada, meu afeto e eterna gratidão.

À Prof^a Dra. Marise Auxiliadora de Barros Reis, pela co-orientação, incentivo no desenvolvimento da pesquisa, pela paciência ao me atender nos momentos de dúvidas, pela capacidade de transmitir conhecimento de forma clara e direta, enfim pelas importantes contribuições nos experimentos.

Ao Prof^o Dr. Roberto V. Veloso, pelo auxílio, atenção, por seu exemplo de dignidade e respeito.

Às Prof^a Dr^a Maria Salete Ferreira Martins, Prof^a Dr^a. Maria Helena Gaíva, pelo auxílio e apoio prestado.

À Prof^a Dr^a. Nair Honda Kawashita, pelas importantes contribuições na revisão do trabalho e por sempre ser tão prestativa nos momentos de necessidade.

À Prof^a Dr^a Vanessa Cristina Arantes, pelas relevantes sugestões apresentadas no exame de Qualificação, pelo empenho, boa vontade e dedicação ao ensinar algumas as técnicas apresentadas no trabalho e principalmente pela paciência em nos atender nos momentos de dúvidas.

À **Prof^a Dr^a. Rosa Helena Veras Mourão**, pela boa vontade em vir a Cuiabá para ensinar a técnica do extrato nuclear e pela capacidade de transmitir conhecimento sobre a técnica de forma tão clara e objetiva.

Ao **Prof^o Dr. Luiz Fabrício Stoppiglia** por ser sempre prestativo nos momentos de necessidade e dúvidas.

Aos **Prof^o Dr. Antônio Carlos Boschero, Prof^o Dr. Everardo Magalhães Carneiro** do Departamento de Fisiologia e Biofísica-UNICAMP, por fornecer reagentes para a determinação de algumas análises.

À amiga **Naoel Hassan Fares**, pelo apoio, colaboração, amizade e por dividir os momentos bons e difíceis durante todo o período de experimento.

Às **alunas de iniciação científica Letícia M.I. Souza, Bárbara L. Botoso, Talita S. S. Gonçalves** pelo apoio, auxílio, dedicação, amizade e pelos momentos de descontração.

À **Marciane Milanski**, pelo auxílio prestado e por fornecer reagentes para a realização de algumas análises.

Ao **Prof^o Dr. Edson Moleta Colodel** pelo valioso auxílio nas análises histológicas e a **Silvana** pela contribuição nas análises bioquímicas.

Às colegas do mestrado, **Maristela Milanski, Denise F.I. Souza, Vera L. Moretto, Ana Flávia M. Pessoa e Cristiana Barbosa** pelo companheirismo, colaboração, amizade e momentos de alegria e confiança.

Ao técnico de laboratório e amigo, **Celso Roberto Afonso**, pelo auxílio, responsabilidade, aplicação e sobretudo pela amizade mútua.

À todos os alunos de pós-graduação e iniciação científica da Prof^a Dr^a. Nair Honda Kawashita que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho, e principalmente à Maísa Pavani e à Ana Carolina por ensinar algumas técnicas importantes para a elaboração do trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação pela confiança e apoio financeiro para apresentação do trabalho em eventos importantes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT), pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do meu trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa que propiciou a dedicação exclusiva ao curso de Mestrado em Ciências da Saúde.

Meu agradecimento e respeito aos Animais de Laboratório, que doaram a vida à pesquisa.

À todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho, meu sincero agradecimento.

"(...) cada pessoa, em sua existência, pode ter duas atitudes: Construir ou Plantar. Os construtores podem demorar anos em suas tarefas, mas um dia terminam aquilo que estavam fazendo. Então param, e ficam limitados por suas próprias paredes.

A vida perde o sentido quando a construção acaba.

Mas existem os que plantam. Estes, às vezes sofrem com tempestades, as estações, e raramente descansam. Mas, ao contrário de um edifício, o jardim jamais pára de crescer. E, ao mesmo tempo que exige a atenção do jardineiro, também permite que, para ele, a vida seja uma grande aventura.(...)"

Paulo Coelho, Prólogo de Brida.

“O conhecimento é algo fantástico e intrigante, pois quanto mais aprendemos, descobrimos que menos sabemos”.

André Prado

SUMÁRIO

RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
I - INTRODUÇÃO	16
II - REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Caracterização e epidemiologia da esteatose hepática.....	20
2.2. Regulação da síntese de lipídios no fígado.....	21
2.3. Hipótese do “Fenótipo Econômico”.....	24
2.4. Papel da soja na regulação do perfil e metabolismo lipídico.....	27
III - OBJETIVOS	28
3.1 - Geral	29
3.2 - Específicos	29
IV - MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Animais	31
4.2. Dietas	32
4.3. Procedimentos Experimentais	36
4.3.1. Coleta de amostras e análises.....	36
4.3.2. Determinações Bioquímicas e Hormonais.....	36
4.3.2.1. Proteínas totais..	36
4.3.2.2. Triglicerídeos.....	36
4.3.2.3. Glicose	37
4.3.2.4. Aminotransferases hepáticas.....	37
4.3.2.5. Glucagon.....	37
4.3.2.6. Insulina.....	37
4.3.3. Determinação da resistência à insulina.....	38
4.3.4. Medida da atividade da Enzima málica e ATP - citrato liase.....	39
4.3.5. Determinação da síntese de ácido graxos in vivo com ³ H ₂ O.....	40
4.3.6. Determinação do conteúdo lipídico do fígado.....	41
4.3.7. Histologia Hepática.....	41

4.4. Determinações moleculares.....	43
4.4.1 <i>Western blotting</i> do extrato nuclear.....	42
4.4.1.1 Anticorpos, reagentes químicos e materiais	42
4.4.1.2. Obtenção do extrato nuclear e citoplasmático.....	42
4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
V - RESULTADOS	45
VI- DISCUSSÃO	56
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas controle, hipoprotéica e à base de farinha de soja utilizadas na primeira e segunda fase experimental (g/Kg).	34
Tabela 2 – Composição nutricional da farinha integral de soja micronizada inativa.....	34
Tabela 3 – Composição de aminoácidos da farinha integral de soja micronizada inativa e da caseína.....	35
Tabela 4 – Parâmetros metabólicos e bioquímicos 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.....	48
Tabela 5 – Análise do dano hepático através da dosagem de enzimas hepáticas como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP) 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.	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Conteúdo de gordura hepática 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..... 49
- Figura 2.** Análise histológica (corada com hematoxilina e eosina) do conteúdo lipídico em amostras de fígados de ratos adultos mantidos com dieta à base de caseína [CC (A) e RC (C)], farinha integral de soja [CS (B) e RS (D)] e dieta hipoprotéica [(HP (E))] após o desmame..... 50
- Figura 3.** Síntese de ácidos graxos in vivo 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..... 51
- Figura 4.** Atividade da enzima málica (A) e ATP-citrato liase (B) 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..... 52
- Figura 5.** Expressão protéica do fator de transcrição SREBP-1C (A) e PPAR γ (B) hepático 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..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS

CC	Grupo controle caseína
CS	Grupo controle soja
RC	Grupo recuperado caseína
RS	Grupo recuperado soja
HP	Grupo hipoprotéico (desnutrido)
SREBP-1c	Proteínas ligadoras dos elementos regulados por esteróis
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores do peroxissoma gama
TG	Triglicerídeos
PPRE	Elementos de resposta ao PPAR
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
GGT	Gama glutamil transferase
ALP	Fosfatase Alcalina
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
DNA	Ácido desoxirribonucléico
AG	Ácidos graxos
IR	Receptor de insulina
PKA	Proteína quinase A
kDa	Quilodalton
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
BSA	Soro de Albumina Bovina
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance</i>

RESUMO

Estudos indicam que desnutrição na vida intra-uterina e neonatal pode causar programação metabólica na prole levando ao diabetes tipo 2 e obesidade na vida adulta. A crescente prevalência dessas doenças tem sido considerada responsável pelo elevado número de indivíduos com esteatose hepática. O consumo de soja regula a expressão de mediadores moleculares da esteatose hepática prevenindo o desenvolvimento de fígado gorduroso. Este estudo teve o objetivo de avaliar as repercussões da recuperação nutricional com dieta à base de soja sobre a síntese de lipídios hepáticos e alguns fatores hormonais, bioquímicos e moleculares envolvidos na sua regulação. Proles de mães alimentadas com 17% ou 6% de proteína (caseína) durante prenhez e lactação foram mantidas com dieta com 17% de caseína (grupos CC e RC) ou farinha integral de soja (grupos CS e RS) do desmame até os 90 dias de idade. Ratos CS e RS exibiram baixo peso corporal, concentrações de glicose e triglicérides séricos normais, concentrações séricas de insulina e de ALT aumentadas, elevado índice HOMA, similar concentração sérica de glucagon e da razão insulina/glucagon comparado com ratos CC e RC. A dieta à base de farinha integral de soja não alterou a expressão protéica do SREBP-1c, mas diminuiu a expressão do PPAR γ , bem como a atividade das enzimas málica e ATP citrato liase. Essas alterações foram acompanhadas por diminuição da lipogênese *in vivo* e do conteúdo gordura hepática. Assim, dieta à base de farinha de soja produziu resistência à insulina hepática que foi acompanhada pelo reduzido armazenamento gordura hepática, devido pelo menos em parte à diminuída expressão protéica do PPAR γ e pela reduzida atividade das enzimas málica e ATP-citrato liase. Entretanto, a dieta à base de farinha integral de soja não teve efeito protetor sobre a função hepática, a considerar o aumento da concentração sérica da aminotransferase ALT.

Palavras-chaves: soja, resistência à insulina, lipogênese, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e recuperação nutricional.

ABSTRACT

Studies indicate that malnutrition in the fetal and neonatal life may programme offspring susceptibility to later development of obesity and type 2 diabetes. The rising prevalence these diseases have been considered responsible for the high number of individuals with hepatic steatosis. The consumption of soy regulates the expression of molecular mediators of hepatic steatosis preventing the development of fatty liver. The aim of this study was to investigate if nutritional recovery with a soybean flour diet alter the SREBP-1c and PPAR γ protein expression and the activities of lipogenic enzymes (malic and ATP citrate lyase enzymes), contributing to prevention of hepatic steatosis. 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 rats had low body weight, normal basal serum glucose and serum triglyceride concentrations, increased serum insulin and ALT concentrations, high HOMA index, similar serum glucagon levels and the insulin/glucagon ratio compared with CC and LC rats. Soybean diet did not alter the SREBP-1c expression and diminished the PPAR γ expression, as well as the ATP citrate lyase and malic enzyme activities. The liver fat content was lower in recovered than in control rats and in those fed with soybean diet than in those fed with casein diet. Thus, soybean diet produced insulin resistance that was accompanied by reduced liver fat storage, due at least in part to decreased PPAR γ protein expression and malic enzyme and ATP-citrate lyase activities. However, soybean diet did not exert the protector effect on hepatic function, whether taking into account the raise of serum ALT concentration.

Key Words: soybean, insulin resistance, lipogenesis, Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nutritional recovery.

I - INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica é reconhecida como um dos tipos de patologias hepáticas mais comum,¹ sendo a esteato-hepatite não alcoólica considerado o ponto crítico, porque freqüentemente indica a progressão para fases mais avançadas como cirrose e carcinoma hepatocelular.^{2,3}

O fígado tem papel central no metabolismo de lipídio, por importar ácidos graxos livres séricos, fabricar, armazenar e exportar lipídios e lipoproteínas.⁴ O acúmulo excessivo de triglicerídeos hepáticos está associado a fatores nutricionais, ao uso de várias drogas, e múltiplos defeitos genéticos que repercutem no metabolismo energético. Entretanto, a desordem mais comum associada com esteatose hepática é a resistência à insulina.⁵

Uma série de alterações fisiológicas e moleculares acontece no quadro de resistência à insulina e resulta no acúmulo de triglicerídeos no fígado. A resistência à insulina aumenta concentrações séricas de ácidos graxos livres, os quais são captados pelo fígado e dirigidos para a produção de triglicerídeos, resultando em esteatose hepática.⁶ Além disso, a hiperinsulinemia crônica altera a expressão de fatores de transcrição lipogênicos, o que resulta no aumento da síntese de ácidos graxo *de novo* no fígado.⁶⁻⁸

Diferentes modelos animais para obesidade, resistência à insulina e/ou doença hepática gordurosa não alcoólica têm sido desenvolvidos.⁹ O grupo de pesquisa do Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos da Universidade Federal de Mato Grosso tem avaliado ratos recuperados da desnutrição protéica sofrida em fases iniciais da vida (vida intra-uterina e lactação), um modelo experimental que apresenta déficit da secreção de insulina¹⁰ e resistência hepática a esse hormônio.¹¹ Esse grupo tem usado uma dieta a base de farinha de soja como fonte protéica alternativa de baixo custo e alta qualidade para a recuperação destes animais, na tentativa de prevenir e/ou tratar as conseqüências tardias da

desnutrição. Esta escolha foi motivada pelas evidências científicas que mostram que pelo menos um dos componentes da soja, a genisteína, aumenta a secreção de insulina.¹²

Ratos desnutridos recuperados com dieta à base de soja apresentaram aumento da concentração sérica de insulina e moderada resistência hepática à insulina,¹³ uma situação que poderia interferir no metabolismo lipídico e na função hepática.

Assim, este estudo avaliou o efeito da dieta à base de soja na recuperação de animais com desnutrição protéica sobre alguns mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos no metabolismo de ácidos graxos hepáticos.

II – REVISÃO DE LITERATURA

II - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caracterização e epidemiologia da Esteatose hepática

A doença hepática gordurosa não alcoólica é uma das patologias hepáticas mais comuns nos países desenvolvidos, com grande prevalência entre obesos (76%), diabéticos tipo 2 (50%),^{4,11,15} e provavelmente se subestima os casos de cirrose que dela podem advir.

¹⁶ Evidências indicam que esta patologia hepática está emergindo como um componente da síndrome metabólica, embora não se saiba se os seus marcadores, incluindo as concentrações séricas das aminotransferases (alanina aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase – AST) e fosfatase alcalina (ALP) elevadas, predizem essa síndrome.¹⁷

Histologicamente a doença hepática gordurosa não alcoólica é uma condição clínico-patológica comum, caracterizada pela deposição de lipídios no parênquima hepático de pacientes sem histórico de consumo excessivo de álcool.¹⁸ É considerada a mais comum doença hepática relacionada à obesidade. Embora possa ocorrer em pacientes eutróficos, a maioria dos casos ocorre em indivíduos com sobrepeso e em obesos.¹⁹ Tanto a obesidade quanto o diabetes tipo 2 estão fortemente associados à resistência à insulina,^{20,21} por isso a prevalência de esteatose nestes grupos é muito maior.¹

A resistência à insulina é o mecanismo desencadeador do desenvolvimento da esteatose hepática mais citado, seguido do estresse oxidativo que produz peroxidação lipídica e que provavelmente aumenta a agressão ao tecido hepático, conduzindo a esteato-hepatite não alcoólica. A combinação da elevada concentração plasmática de glicose e ácidos graxos promove a síntese de ácido graxo e diminui a β oxidação levando à esteatose hepática.^{22,23}

A alteração laboratorial mais comum em pacientes portadores da doença hepática gordurosa não alcoólica é a elevação, de leve à moderada, das concentrações séricas de ALT e AST.⁵ Alguns estudos registram que as aminotransferases geralmente não excedem três a quatro vezes o limite superior da normalidade, com predomínio da ALT.^{24,25} As

concentrações séricas de fosfatase alcalina também podem estar discretamente elevadas em um terço dos pacientes portadores da doença.

A gama-glutamil transferase também é considerado um marcador da injúria hepática e normalmente concentrações séricas aumentadas desta enzima em paralelo com a fosfatase alcalina indica doença hepatobiliar colestática. A gama-glutamil transferase pode ser mais sensível do que a fosfatase alcalina para detectar colestase moderada.²⁶ A hiperbilirrubinemia, a hipoalbuminemia e o tempo prolongado de protrombina são incomuns²⁷ e geralmente ocorrem quando a falência hepática está estabelecida. A hiperlipidemia e a hiperglicemia também são comuns em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica.²⁸

2.2. Regulação da síntese de ácidos graxos no fígado

O acúmulo de gordura hepática é determinado pelo balanço entre síntese e degradação de triglicerídeos, denominados respectivamente lipogênese e lipólise. A lipogênese hepática é regulada por nutrientes (glicose e ácidos graxos) e hormônios, cujos efeitos pró ou anti-lipogênicos são mediados por fatores de transcrição que alteram a expressão de genes lipogênicos.²⁹

A ativação da síntese de ácido graxo hepático por carboidratos (glicose) é mediada por vários mecanismos. Primeiramente, a própria glicose é um substrato para a lipogênese ao ser degradada a acetil-CoA e oxaloacetato. Estes sofrem condensação, formando citrato, que por sua vez é lançado para o citosol e reconvertido a acetil-CoA e oxaloacetato pela ATP-citrato liase. Acetil-CoA carboxilase então, converte parte do acetil-CoA em malonil-CoA, sendo ambos substratos da sintase de ácido graxo para a formação de ácido palmítico³⁰. Adicionalmente, o oxaloacetato é reduzido pela malato desidrogenase a malato, o substrato da enzima málica com a produção de NADPH, uma das principais fontes de equivalentes redutores requeridos para a síntese *de novo* de ácido palmítico.^{31,32} Segundo, a

glicose ativa um fator de transcrição denominado proteína ligadora de elementos responsivos a carboidratos (ChREBP). O ChREBP regula a expressão hepática de enzima chave da via glicolítica (piruvato quinase) que fornece acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos, bem como a transcrição de todos os genes lipogênicos.³⁰ Finalmente a glicose aumenta a lipogênese por estimular a liberação de insulina e por inibir a liberação de glucagon pelo pâncreas.²⁹

A insulina é provavelmente o principal fator hormonal que influencia a lipogênese, por ativar as enzimas ATP-citrato liase e enzima málica, via modificações covalentes.^{33,34} Esses efeitos são desencadeados pela ligação da insulina ao seu receptor na membrana celular, ativando sua atividade tirosina quinase e induzindo efeitos via fosforilação em tirosina/serina.^{35,36} A insulina também influencia a síntese de ácidos graxos por estimular a expressão de genes e atividade de enzimas lipogênicas,³⁷ sendo este efeito mediado pelo fator de transcrição SREBP-1c (Proteína ligadora de elementos regulados por esteróides 1c).²⁹

O SREBP-1c é uma das três isoformas de SREBP, pertencente à família de fatores de transcrição hélice-alça-hélice básico (bHLH) e contém uma região que forma um *zipper* de leucina.³⁸ A isoforma SREBP-1c aumenta preferencialmente a transcrição de genes requeridos para a síntese de ácidos graxos, incluindo aqueles que codificam a ATP-citrato liase, acetil- CoA carboxilase e ácido graxo sintase, além de outros três genes requeridos para a geração de NADPH, que é consumido durante a lipogênese.^{39,40} O aumento da expressão do SREBP-1c no fígado de ratos transgênicos leva ao desenvolvimento de fígado gorduroso.^{40,41}

A insulina⁴² e o SREBP-1c⁴³ estimulam a expressão do gene do PPAR- γ (receptor ativado por proliferadores do peroxissoma gama). O PPAR γ é um dos três membros da super família de receptores de hormônios nucleares (α , β/δ e γ) e é requerido para

diferenciação do adipócito normal⁴⁴ e participa da ativação transcricional de numerosos genes lipogênicos. A ação dos PPARs (antiinflamatória, hipolipemiante, antidiabética) é dependente dos ligantes e, estes, por sua vez, podem ser naturais ou endógenos, como os ácidos graxos (linoléico, linolênico e araquidônico) e seus derivados, ou sintéticos, como as drogas antiinflamatórias, hipolipemiantes e antidiabéticas. Em hepatócitos, o PPAR- γ aumenta a expressão de enzimas lipogênicas tais como a ácido graxo sintase e acetil-CoA carboxilase aumentando a síntese *de novo* de lipídios.⁴⁵ Normalmente o PPAR γ é pouco expresso no fígado, porém, em modelos animais com resistência à insulina e fígado gorduroso, a expressão do PPAR γ é notavelmente aumentada.⁴⁶⁻⁴⁸

Um outro hormônio que influencia a lipogênese de maneira antagônica à insulina é o glucagon, que atua aumentando o AMP cíclico.⁴⁰ Estudos têm mostrado que a incubação de hepatócitos de ratos com glucagon ou AMP cíclico dibutilil diminui o RNA mensageiro do SREBP-1c e seus genes alvos associados à lipogênese.^{49,50,51,52} *In vivo*, a expressão de SREBP-1c no fígado é reduzida no jejum, uma condição caracterizada pelo aumento da concentração sérica de glucagon e diminuição da insulinemia.^{53,54}

Estados de resistência à insulina têm sido associados à doença hepática gordurosa não alcoólica por seus efeitos sobre o metabolismo lipídico. A resistência à insulina é caracterizada por hiperinsulinemia, aumento da produção hepática de glicose e diminuição da deposição de glicose. No tecido adiposo, a resistência à insulina aumenta a atividade da lipase hormônio sensível, o que resulta em taxas elevadas de lipólise e aumento do fluxo de ácidos graxos livres para o fígado. Os ácidos graxos livres podem ser oxidados na mitocôndria para formar ATP ou esterificados, produzindo triglicerídeos que são estocados ou incorporados em partículas de VLDL. No fígado a hiperinsulinemia induz a expressão do SREBP-1c, que resulta no aumento da transcrição de todos os genes lipogênicos. Simultaneamente, a hiperglicemia ativa o ChREBP, que ativa transcrição da

fosfofrutoquinase e todos os genes lipogênicos. As ações sinérgicas da SREBP-1c e do ChREBP ativam coordenadamente a maquinaria enzimática necessária para conversão do excesso de glicose a ácido graxo. Em consequência ao aumento da síntese de ácidos graxos, ocorre elevação da produção de malonil-CoA que inibe a CPT-1 (carnitina palmitoil transferase 1) uma proteína responsável pelo transporte do ácido graxo para mitocôndria. Assim, no quadro de resistência à insulina, os ácidos graxos livres oriundos da periferia e aqueles derivados da lipogênese *de novo* são preferencialmente esterificados a triglicerídeos.³⁰

2.3. Hipótese do “Fenótipo Econômico”

A influência da inadequação nutricional sobre o crescimento e desenvolvimento fetal e neonatal e sua relação com o aparecimento de doenças metabólicas na vida adulta, têm merecido intensa investigação científica nas últimas décadas. A “hipótese do fenótipo da economia” formulada nos anos 90 por Hales & Barker⁵⁵ tenta explicar essa associação. De acordo com esta hipótese, condição nutricional desfavorável durante as fases críticas de desenvolvimento, promoveria uma “programação metabólica” que durante a vida fetal e neonatal garantiria a sobrevivência do feto, mas predisporia ao aparecimento de doenças na maturidade, como a síndrome metabólica.⁵⁵

O tipo de deficiência nutricional que torna o feto ou infante suscetível à síndrome metabólica não é conhecido. A maioria dos estudos que testou a hipótese do “fenótipo econômico” avaliou roedores submetidos à restrição protéica durante a vida intra-uterina e/ou lactação ou uma combinação de vida intra-uterina, lactação e após o desmame.

A restrição protéica imposta durante a vida intra-uterina e a lactação produz danos morfológicos e funcionais irreversíveis no pâncreas endócrino. Proles de ratas mantidas com dieta hipoprotéica durante a prenhez e a lactação, possuem número reduzido de células β e

aumentado de células α pancreáticas.⁵⁶ Ocorre também redução do tamanho e vascularização das ilhotas pancreáticas,⁵⁷ bem como redução da densidade, massa absoluta e conteúdo de insulina das células β .⁵⁸ A secreção de insulina em resposta à glicose, a aminoácidos e a estímulos não nutrientes encontra-se diminuída.⁵⁹⁻⁶²

Os tecidos sensíveis à insulina também sofrem alterações morfológicas e funcionais importantes em resposta à desnutrição intra-uterina e pós-natal. O fígado de ratos submetidos à restrição protéica em fases críticas do desenvolvimento, possui lóbulos maiores em comparação aos animais controles, mas as conseqüências dessa alteração anatômica ainda são desconhecidas.⁶³ Esses animais apresentam redução de 80% na expressão dos receptores de glucagon e aumento da expressão dos receptores de insulina.¹¹

Nesse modelo animal, a atividade da glicoquinase hepática está diminuída e a da fosfoenolpiruvato carboxiquinase está aumentada, indicando o aumento da síntese ao invés de utilização da glicose.⁶⁴ Essas alterações são acompanhadas por mudanças paralelas nos níveis do RNA mensageiro dessas enzimas, indicando que os efeitos da desnutrição também se estendem à regulação da expressão dos genes dessas proteínas.⁶⁵ As alterações da atividade das enzimas hepáticas e o aumento dos receptores de insulina têm sido atribuídos às mudanças nas zonas metabólicas do fígado. A glicoquinase e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase são produzidas em diferentes zonas hepáticas: a primeira é encontrada na região central ao redor da veia hepática (zona perivenosa) e a última na região do trato portal (zona periportal)⁶⁶. Existe um gradiente de receptores de insulina com uma alta densidade na zona periportal e uma baixa densidade na zona perivenosa.⁶⁷ Acredita-se que a desnutrição causa uma alteração permanente da população de células hepáticas, resultando em expansão da região periportal e contração da região perivenosa.^{11,65}

Estudo de perfusão mostrou que o fígado de ratos adultos (três meses de vida) submetidos à restrição protéica na vida intra-uterina e na lactação apresenta respostas

alteradas ao glucagon e à insulina. O glucagon é incapaz de aumentar a produção de glicose hepática, indicando um estado de resistência a esse hormônio. A insulina causa um aumento inicial da produção de glicose hepática ao invés da esperada redução,¹¹ caracterizando um estado de resistência hepática à insulina. Resposta similar à insulina tem sido observada em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.^{68,69} Contudo, esses animais não apresentam hiperglicemia nem dislipidemias.

Recentemente, foi observado em ratos submetidos à desnutrição intra-uterina, aumento da expressão gênica e protéica do SREBP-1c e da enzima ácido graxo sintase que se correlacionou positivamente com a deposição de triglicerídeos e colesterol hepáticos. Notavelmente, esses animais não apresentaram obesidade nem aumento das concentrações séricas de lipídios.⁷⁰ Essas observações sugerem que a desnutrição em fases críticas do desenvolvimento pode contribuir para a instalação do quadro de fígado gorduroso.

2.4. Papel da soja na regulação do perfil e metabolismo lipídico

A soja - *Glycine max (L.) Merril* – é um importante alimento para a nutrição humana e animal, além de ser muito utilizada com propósitos industriais. Aproximadamente 60% de todos os alimentos processados contêm ingredientes derivados da soja. Apesar de ser deficiente em aminoácidos sulfurados como metionina e cistina, a soja contém grande quantidade de proteínas (aproximadamente 38%); 18% de gordura; 30% de carboidrato; 14% de umidade, cinzas e outros componentes secundários. A soja também é uma importante fonte de vários minerais, vitaminas, fitoestrógenos e fibras.⁷¹

Além do seu alto valor nutricional, a soja apresenta ação preventiva e/ou terapêutica sobre uma série de doenças como diabetes mellitus, obesidade, enfermidades cardiovasculares e câncer, sendo considerada como um alimento funcional. Esse termo é aplicado para alimentos ou ingredientes que além de ter funções nutricionais básicas, produzem efeitos fisiológicos e/ou metabólicos que são benéficos à saúde, quando

consumidos como parte de uma dieta habitual, sendo seguros para o consumo sem a necessidade de uma supervisão médica.^{72,73} Grande parte dos efeitos biológicos benéficos atribuídos à soja se deve à composição de aminoácidos de sua proteína e às isoflavonas.⁷⁴

Estudos experimentais têm mostrado que a proteína da soja melhora o perfil lipídico plasmático, diminuindo colesterol total, LDL colesterol, triglicerídeos e aumentando significativamente o HDL colesterol.⁷⁵ Este efeito é potencializado quando há associação com as isoflavonas.⁷⁴ A ação hipolipemiante da proteína da soja tem sido atribuída a sua composição aminoacídica,^{76,77} que reduz a razão insulina/glucagon por diminuir as concentrações séricas de insulina e aumentar as de glucagon.⁷⁸

O consumo de proteína da soja previne o acúmulo de triglicerídeos no fígado, reduzindo o efeito deletério da lipotoxicidade. A utilização dessa fonte protéica provocou uma redução de aproximadamente 54% na expressão do RNA mensageiro do SREBP-1c e da expressão gênica e protéica de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos (ATP-citrato liase, acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase, enzima málica), indicando diminuição da lipogênese.^{75,79}

Um outro mecanismo pelo qual a proteína da soja previne o acúmulo de ácidos graxos e triglicerídeos no fígado é pela ativação da expressão gênica do PPAR α .⁷⁹ PPAR α é um fator de transcrição que controla a oxidação dos ácidos graxos por induzir a transcrição da CPT-1 e várias enzimas chave da β oxidação.⁸⁰⁻⁸²

A genisteína (a principal isoflavona da soja) parece reduzir as concentrações de lipídios séricos e hepáticos. O efeito redutor da gordura hepática parece resultar do aumento da β oxidação de ácidos graxos, possivelmente determinado pela superexpressão do gene e ativação do PPAR- α ^{83,84}, aumento da transcrição gênica do PGC-1 (um co-ativador do PPAR) e da MCAD (acil-CoA desidrogenase de cadeia média).⁸⁵

III - OBJETIVOS

III - OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar as repercussões da recuperação nutricional com dieta à base de soja sobre a síntese de ácidos graxos hepáticos e alguns fatores hormonais, bioquímicos e moleculares envolvidos na sua regulação.

3.2. Específicos

- ✓ Determinar as concentrações séricas de proteínas totais, glicose, triglicerídeos, insulina e glucagon em ratos adultos após a recuperação nutricional com dieta à base de farinha integral de soja micronizada inativa.
- ✓ Avaliar a sensibilidade à insulina em ratos adultos após recuperação nutricional com dieta à base de farinha integral de soja micronizada inativa.
- ✓ Avaliar a expressão protéica do SREBP-1c e PPAR- γ em fígado de ratos adultos após recuperação nutricional com dieta à base de farinha integral de soja micronizada inativa.
- ✓ Verificar a atividade das enzimas málica e ATP-citrato liase em fígado de ratos adultos após a recuperação nutricional com dieta à base de farinha integral de soja micronizada inativa.
- ✓ Determinar a taxa de síntese de ácido graxo *in vivo* em fígado de ratos adultos após a recuperação nutricional com dieta à base de farinha integral de soja micronizada inativa.
- ✓ Determinar o conteúdo de gordura hepática em ratos adultos após recuperação nutricional com dieta à base de farinha integral de soja micronizada inativa.
- ✓ Analisar a histo-morfologia do tecido hepático de ratos adultos após recuperação nutricional com dieta à base de farinha integral de soja micronizada inativa.
- ✓ Avaliar o dano hepático em de ratos adultos após recuperação nutricional com dieta à base de farinha integral de soja micronizada inativa.

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

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 respectivas dietas:

- ✓ Grupo Controle (CC): prole de mães alimentadas com dieta normoprotéica durante a prenhez e a lactação e subseqüentemente 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)*

4.2. Dietas

As dietas cujas composições encontram-se descritas na Tabela 1, foram utilizadas nas fases de prenhez, lactação e recuperação e foram preparadas no Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos.

O grupo controle (primeira fase), 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 a 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.

As dietas hipoprotéica, controle à base de caseína e de farinha integral de soja eram isocalóricas.

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 encontra-se descrita nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 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 ¹	397,0	480,0	312,2
Amido de milho dextrinizado ¹	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

*Reeves *et al.* 1993⁸⁶

¹ Corn Products do Brasil, São Paulo.

Tabela 2 – Composição nutricional da farinha integral de soja micronizada inativa.

Componentes	Em 100 g
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)

Tabela 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)

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.

4.3. Procedimentos experimentais

4.3.1. Coleta de amostras e análises:

No final do período experimental, aos 90 dias de idade, amostras de sangue foram coletadas e o soro ou plasma obtidos foram armazenados a -80°C para subsequente dosagem da concentração sérica de insulina, glucagon, proteína total e de aminotransferases hepáticas. Um grupo de ratos foi anestesiado com pentabarbital de sódio (100 de mg/kg de peso corporal) e submetidos a laparotomia mediana para retirada do fígado. O fígado foi rapidamente removido, fracionado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado à -80 °C para determinação da atividade das enzimas málica e ATP-citrato liase, conteúdo de gordura hepática, bem como, para expressão do SREBP-1c e PPAR γ por *immunoblotting*. Um fragmento de fígado foi preservado para análise histológica. De outro grupo de ratos alimentados foi retirado o fígado para determinar a taxa de síntese de ácido graxo *de novo in vivo*.

4.3. 2. Determinações bioquímicas e hormonais

4.3.2.1. Proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi realizada utilizando o método de biureto modificado. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro modelo 395, marca Micronal, em comprimento de onda de 545 nm.⁸⁷

4.3.2.2. Triglicerídeos

Foram determinados utilizando-se método enzimático com kit específico da Wiener Lab, no equipamento automatizado BT-3000 Plus da Wiener Lab, Rosário, Argentina.

4.3.2.3. Glicose

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

4.3.2.4. Enzimas hepáticas

As enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e gama-glutamil transferase (GGT) foram determinadas utilizando-se método enzimático com kit específico da Wiener Lab, através de análises automatizadas no equipamento BT-3000 Plus da Wiener Lab, Rosário, Argentina.

4.3.2.5. Glucagon

As concentrações séricas de glucagon foram determinadas por Elisa utilizando kit comercial específico (Rat Glucagon Elisa Kit Waco, Waco Pure Chemical Industrie LTDA; Japão). O resultados foram expressos pmol/L.

4.3.2.6. Insulina

A concentração de insulina sérica foi determinada por radioimunoensaio, de acordo com o método descrito por Scott *et al.* (1981).⁸⁸ 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 ¹²⁵I (traçador) em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl 0,9% e albumina 0,5%. Em seguida foram preparados os seguintes controles:

a) 3 tubos (Totais) que receberam somente 0,2 mL do tampão fosfato com insulina marcada ¹²⁵I para averiguação da radiação máxima.

b) 3 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) 3 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), com 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 $\bar{\text{ng}}/\text{mL}$. 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 de insulina.

4.3.3. Determinação da resistência à insulina

O índice fisiológico de resistência à insulina adotado neste estudo foi o *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* (HOMA-IR), modelo matemático simplificado de representação do sistema homeostático glicose-insulina, preditivo da resistência à insulina.

Este índice foi determinado utilizando as concentrações séricas de glicose e de insulina de jejum, de acordo com a fórmula: HOMA-IR= glicemia de jejum (mmol/L) x insulina de jejum (μ U/mL) /22.5.

4.3.4. Medida da atividade da Enzima málica e ATP - Citrato liase

Para avaliar a atividade das enzimas málica e ATP-citrato liase o tecido hepático coletado foi homogeneizado em 1mL de tampão TRIS 10mM (sacarose 0,32M, EDTA 2mM e 2- β -mercaptoetanol 5mM, pH 7,4) para cada 100mg de tecido, e centrifugado por 10 minutos a 2300G. A camada superior foi descartada e a fração sobrenadante centrifugada a 11200 G por 2 horas para obtenção da fração citosólica.

A atividade da enzima málica foi avaliada medindo-se a formação de NADPH a partir de L-malato e NADP^+ . O método utilizado foi primeiramente descrito por Ochoa (1955)⁸⁹ e modificado por Hsu & Lardy (1969).⁹⁰ A formação do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro (340nm), e o ritmo de sua formação, proporcional a concentração da enzima. O sistema de ensaio continha tampão trietanolamina 6mM, L-malato 5mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4mM, NADP^+ 0,2mM. A reação foi iniciada com L-malato, que foi omitida do branco.

A determinação da atividade da ATP- citrato liase foi realizada como descrito por Srere (1959),⁹¹ sendo que a oxidação do NADH foi acompanhada por espectrofotometria a 340nm por 3 minutos. A mistura de reação foi composta de tampão de trietanolamina 83,3M, pH= 7,7, citrato de potássio 200mM, NADH 2mM, cloreto de magnésio 160mM, ATP 140mM, 2- β mercaptoetanol 200mM, coenzima A 4,8mM, NADH-malato desidrogenase 2 U/mL. Os resultados foram expressos em nmol de NADP/mg de proteína.min.

4.3.5. Determinação da síntese de ácido graxos *in vivo* com $^3\text{H}_2\text{O}$

Foi administrado em ratos anestesiados 3 mCi $^3\text{H}_2\text{O}$ em 0,3 mL de salina através de injeção de intraperitoneal, 1 hora antes do experimento. Os animais foram sacrificados por decapitação e amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados para a obtenção do plasma para determinação da atividade específica. O tecido hepático foi rapidamente removido e pesado. A extração de lipídios das amostras de fígado foi realizada utilizando clorofórmio:metanol (2:1) de acordo com o método de Folch *et al.* (1957).⁹² Após a extração, o material foi filtrado e a 8 mL do filtrado foi adicionado 1,6 mL de solução salina (NaCl 0,9%) e em seguida centrifugado por 600 G por 10 minutos. A fase superior aquosa foi aspirada e a fase clorofórmica foi lavada por 3 vezes com a mistura da fase superior preparada com clorofórmio, metanol e mistura salina na proporção de 21,1: 337: 330mL, respectivamente. A mistura de salina foi preparada com 0,528g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,732g de $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5,8g de NaCl e 640 mL de água deionizada. Nesta etapa foi separada uma alíquota de 2mL para a determinação dos lipídios totais. Para o isolamento de ácidos graxos uma alíquota de 4mL do extrato clorofórmico foi evaporado em banho-maria e os lipídios foram saponificados com 2 mL de KOH etanólico (1mL de KOH saturado para 20 mL de etanol).

Os tubos foram tampados e submetidos a aquecimento no banho-maria a 75 °C por 2 horas. Em seguida, os tubos foram destampados e foi adicionados 3mL de água milli-Q e continuaram em banho-maria a 40 °C até a evaporação de todo o álcool. O material saponificado foi lavado três vezes com 6mL de éter de petróleo, para a remoção dos lipídeos não saponificáveis. Posteriormente, o material foi acidificado com HClO_4 e os ácidos graxos foram extraídos com éter de petróleo. Todo o éter das amostras foi evaporado em capela e o resíduo que ficou no frasco foi dissolvido em 10mL de coquetel de cintilação tolueno-PPO

(0,5%) para contagem dos ácidos graxos.⁹³ A radioatividade incorporada foi determinada em contador beta (Tri-Carb 2100 TR Parckard, A Canberra Company, Alemanha).

4.3.6. Determinação do conteúdo lipídico do fígado

A extração do conteúdo lipídico foi realizada de acordo com o método de Folch *et al.* (1957).⁹² Foi pesado 1g do tecido hepático sendo grosseiramente fracionado e adicionado em solução de clorofórmio: metanol (2:1). O material foi homogeneizado e completado o volume para 10mL com a mesma solução. Todas as amostras foram deixadas *overnight* para a extração dos lipídios, sendo posteriormente filtradas. Em seguida foi adicionado 1,6 mL de salina a uma alíquota de 8mL do filtrado. Após a separação da fase clorofórmica e aquosa, o material foi centrifugado por 5 minutos a 600G. Uma alíquota de 3 mL da fase clorofórmica foi colocada em placa de *petri* previamente lavada e pesada, sendo mantida em capela para evaporação em temperatura ambiente. O conteúdo de lipídio foi obtido pela diferença entre a pesagem da placa após a evaporação e a pesagem inicial.

4.3.7. Histologia Hepática

Amostras do fígado foram coletadas e armazenada em solução de formaldeído a 4%. Seções embebidas em parafina foram coradas com hematoxilina e eosina. A avaliação histológica incluiu uma análise semi-quantitativa da presença de gordura micro e macrovesicular. Todas as seções foram codificadas e analisadas cegamente pelo patologista sem conhecimento de características relacionadas ao experimento ou do tipo de dieta. O grau de acúmulo de gordura foi classificado em uma escala de 0 a 4 como segue: 0 = nenhuma evidência ou gordura microvesicular pouco visível, 1+ = <25%; 2+ = 25% a 49%, 3+ = 50% a 75% e 4+ = gordura presente em mais de 75% do lóbulo.

4.4. Determinações moleculares

4.4.1. Western blotting do extrato nuclear

4.4.1.1. Anticorpos, reagentes químicos e materiais

Para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) os reagentes e aparelhos foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA). O Metano hidroximetilamina (TRIS), fenil-metilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, e glicerol foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. USA). O kit de quimiluminescência (Super Signal West Pico, Pierce) e a membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, 0.45 µm) foram comprados da Amersham (Aylesbury, UK). O agente anestésico pentobarbital sódico foi adquirido do Hospital Universitário Julio Müller (Cuiabá/MT, Brasil). Os anticorpos anti-SREBP-1c (sc-366, *rabbit polyclonal*) e PPAR γ (sc-7273, *mouse monoclonal*) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA).

4.4.1.2. Obtenção do extrato nuclear e citoplasmático

O extrato nuclear hepático foi obtido por homogeneização em tampão contendo: Hepes 10mM, pH 7,9, KCl 10mM, MgCl₂ 1,5mM, dithiotheitol 1mM, ortovanadato de sódio 1mM, phenylmethylsulfony fluoride 1mM, aprotinina 10µg/mL. Após 10 minutos de incubação no gelo, as amostras foram centrifugadas (2000xg por 10 minutos a 4°C) e lavadas com o mesmo tampão e os *pellets* foram ressuspensos com um novo tampão contendo: Hepes 20mM, pH 7,9, NaCl 10,42M, KCl 10mM, glicerol 20%, dithiotheitol 1mM, ortovanadato de sódio 1mM e aprotinina 10µg/mL. As amostras foram incubadas durante 30 minutos a 4 °C sob agitação constante, e novamente centrifugadas a 16000xg por 30 minutos a 4°C.⁹⁴ As concentrações de proteínas dos sobrenadantes contendo os extratos nucleares foram determinadas pelo método de Bradford.⁹⁵ Foi utilizado como referencial, uma curva-padrão de albumina.

Para o *imunoblot* dos fatores de transcrição foram aplicadas, no gel, alíquotas contendo 20µg de proteína por amostra de extrato nuclear hepático. A seguir, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para a membrana de nitrocelulose, sendo realizadas durante 2h a 120 V em gelo, banhadas com tampão de transferência. No mesmo gel foi aplicada uma amostra padrão de proteínas, ou seja, marcador de peso molecular conhecidos. As proteínas apareciam sob coloração azul no gel de eletroforese e na membrana de nitrocelulose, permitindo a orientação quanto ao peso molecular das bandas observadas. Após transferência, as membranas foram bloqueadas por 3 h à temperatura ambiente com 5% de leite desnatado ou albumina, diluídos em solução basal durante três horas, a temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal em três sessões de dez minutos, e incubada com anticorpos específicos (diluição 1/500) sob agitação constante, *overnight* a 4 °C. Foram então lavadas novamente com solução basal em três sessões de dez minutos e incubadas a seguir com anticorpo secundário anti-*rabbit* ou *anti-mouse* (peroxidase conjugada *anti-rabbit* ou *anti-mouse* – diluição 1/5000) por duas horas à temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas e os anticorpos foram detectados usando kit de quimiluminescência. As membranas foram expostas ao filme de RX (Kodak XAR-Rochester, NY) com intensificador (Peroxidase e enhancer) por aproximadamente 3 minutos. Os filmes foram revelados na forma convencional.

A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autoradiografias reveladas por densiometria ótica, utilizando um scanner (HP 3400) e o programa Scion Image (Scion Corporation). Os dados numéricos obtidos, correspondentes às bandas protéicas foram comparados estatisticamente como descrito a seguir.

4.5. Análises estatísticas

Os resultados são apresentados em média e desvio-padrão 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 teste de comparação múltipla 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.⁹⁶

O teste de independência Qui-Quadrado foi usado para verificar se o grau de acúmulo de gordura, determinado pela análise histológica, foi afetado pelo tratamento. Para a análise, os dados foram agrupados em três classes (0, 1 a 2 e 3 a 4), sendo 0 para sem acúmulo de gordura, 1 a 2 para acúmulo leve a moderado e 3 a 4 para acúmulo de gordura moderado a grave.

Em todos os casos estabeleceu-se um nível de significância para a rejeição da hipótese de nulidade de 5%.

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

V - RESULTADOS

No início da fase de recuperação, os animais provenientes de mães que receberam durante a prenhez e a lactação dieta hipoprotéica (grupos RC, RS e HP) tiveram pesos corporais similares e 66,5% menores do que os animais provenientes de mães que receberam dieta controle (grupos CC e CS) durante o mesmo período. No final do período experimental, o peso corporal foi significativamente influenciado pelo estado nutricional prévio ($F_{1,40}=149,91$; $P<0,001$) e pela dieta usada durante a recuperação ($F_{1,40}=71,41$; $P<0,01$), mas não houve interação entre esse dois fatores. Assim, no final do período experimental o peso corporal dos animais recuperados (grupos RC e RS), foi 25% menor em relação aos animais controles (grupos CC e CS). Os animais mantidos com dieta à base de soja (CS e RS) tiveram pesos corporais 18% menores que os mantidos com caseína (CC e RC). Embora os ratos RS tenham apresentado peso corporal final maior do que os ratos HP ($P<0,001$), seus pesos foram significativamente menores do que os dos ratos RC ($P<0,001$) (Tabela 4).

As concentrações séricas de proteínas totais, glicose e glucagon não foram influenciadas pelo estado nutricional progresso, nem pela dieta e não houve interação entre esses dois fatores, portanto, não diferiu entre os grupos CC, CS, RC e RS. Entretanto, ao avaliarmos a recuperação nutricional, os animais RS e RC apresentaram concentrações séricas de proteínas totais similares entre si e significativamente maiores do que no grupo HP ($P<0,05$). As concentrações séricas de glicose e de glucagon não diferiram entre esses três grupos (RS, RC e HP) (Tabela 4).

A concentração sérica de triglicerídeos foi influenciada pelo estado nutricional progresso ($F_{1,20}= 5,41$; $P<0,05$), pela dieta usada após o desmame ($F_{1,20}= 6,09$; $P<0,05$), bem como pela interação entre esses dois fatores ($F_{1,20}= 5,41$; $P<0,05$). Assim, os grupos RS, CS e CC apresentaram concentração sérica de triglicerídeos similar entre si e menor que

o grupo RC. Os triglicérides séricos dos animais HP não diferiram daqueles exibidos pelos grupos RC e RS (Tabela 4).

A concentração sérica de insulina foi afetada pelo estado nutricional pregresso ($F_{1,26}= 4,95$; $P<0,05$) e pela dieta usada após o desmame ($F_{1,26}= 6,19$; $P<0,02$). Ratos recuperados (grupos RS e RC) tiveram insulinemia menor do que os controles (grupos CC e CS), enquanto aqueles mantidos com dieta à base de soja (grupos CS e RS), apresentaram insulinemia maior que os ratos alimentados com dieta à base de caseína (CC e RC). Quando a recuperação nutricional foi avaliada, observou-se que os animais RS mostraram maior concentração sérica de insulina que os animais RC e HP (Tabela 4).

A razão insulina/glucagon não foi influenciada pelo estado nutricional pregresso, nem pela dieta usada após o desmame, bem como pela interação entre estes fatores. Entretanto ANOVA a um fator mostrou que o grupo RS apresentou razão insulina/glucagon significativamente maior que os grupos RC e HP (Tabela 4).

O índice HOMA-IR foi modificado pela dieta ($F_{1,26}= 34,16$; $P<0,001$), isto é, animais que consumiram dieta à base de soja (grupos CS e RS) tiveram este índice significativamente maior que os animais que consumiram caseína (grupos CC e RC). Ratos RS exibiram índice HOMA-IR maior que os ratos RC e HP (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros metabólicos e bioquímicos 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
Peso corporal inicial (g)	78±13 (10)	71±11 (10)	24±6 (12)	23±3 (12)	28±3 (13)
Peso corporal final (g)	434±53 (10)	364±20 (11)	333±23 ^a (12)	263±13 ^b (12)	154±34 ^c (13)
Proteínas totais (g/L)	56±2 (6)	55±3 (7)	58±3 ^a (11)	56±2 ^a (7)	50±3 ^b (6)
Triglicerídeos (mmol/L)	0,6±0,3 ^B (5)	0,6±0,1 ^B (5)	1,2±0,5 ^{Aa} (7)	0,6±0,1 ^{Bb} (7)	1,0±0,4 ^{ab} (6)
Glicose (mmol/L)	5,3±0,9 (6)	5,2±0,8 (6)	5,6±0,5 (9)	5,5±0,5 (9)	6,1±0,3 (5)
Insulina (pmol/L)	266±107 (6)	305±123 (6)	157±59 ^b (9)	275±59 ^a (9)	132±32 ^b (5)
Glucagon (pmol/L)	176±87 (6)	175±123 (6)	140±62 (9)	138±44 (7)	132±69 (5)
Razão insulina/glucagon	2,0±1,3 (6)	2,8±2,7 (6)	1,3±0,6 ^b (9)	2,3±0,8 ^a (7)	1,2±0,7 ^b (5)
HOMA-IR	2,8±1,5 (6)	9,6±3,7 (6)	5,5±1,9 ^b (9)	9,5±2,5 ^a (9)	5,0±1,3 ^b (5)

Valores em médias ± desvio padrão do número de ratos entre parênteses. Médias com letras maiúsculas diferentes são estatisticamente significantes segundo ANOVA a dois fatores, seguido do Teste LSD. Médias com letras minúsculas diferentes são estatisticamente significantes segundo ANOVA a um fator, seguido do Teste LSD.

A dieta utilizada afetou significativamente o conteúdo de gordura hepática ($F_{1,20}=23,58$; $P<0,001$), sendo que os ratos alimentados com dieta à base de farinha de soja (grupos CS e RS) exibiram menor conteúdo de gordura hepática do que os ratos alimentados com dieta à base de caseína. Ao avaliar a recuperação do estado nutricional o grupo RS apresentou o conteúdo de gordura hepática significativamente menor que os grupos RC e HP (Figura 1).

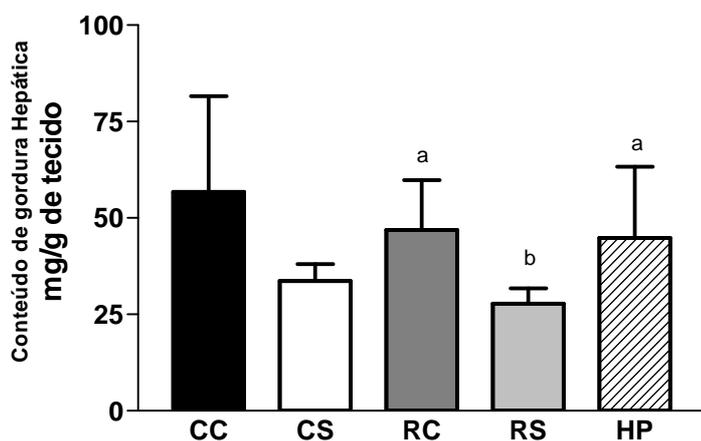


Figura 1. Conteúdo de gordura hepática de ratos adultos mantidos com dieta à base de caseína (CC e RC), farinha integral de soja (CS e RS) e dieta hipoprotéica (HP) após o desmame. Valores em médias \pm desvio-padrão de - ratos. Médias com letras minúsculas diferentes são estatisticamente significantes segundo ANOVA a um fator, seguido do Teste LSD.

A histologia hepática confirmou os achados da determinação do conteúdo de gordura hepática, onde ratos alimentados com dieta à base de farinha integral de soja não exibiram acúmulo anormal de gordura no fígado, visto que 100% das lâminas de fígados dos grupos RS e CS foram graduadas na classe 0. O grupo RC apresentou 40% de suas lâminas com alterações no conteúdo de gordura hepática ficando entre as classes 1-2 e 60% sem alteração, enquanto o grupo CC apresentou 80% de seus espécimes de fígado nas classes 1-2 e 20% na classe 3-4. No grupo HP 60% de seus espécimes de fígado foram graduadas nas classes 1-2 e 40% nas classes 3 e 4. Portanto, os animais CC e HP exibiram maior acúmulo de gordura hepática (Figura 2).

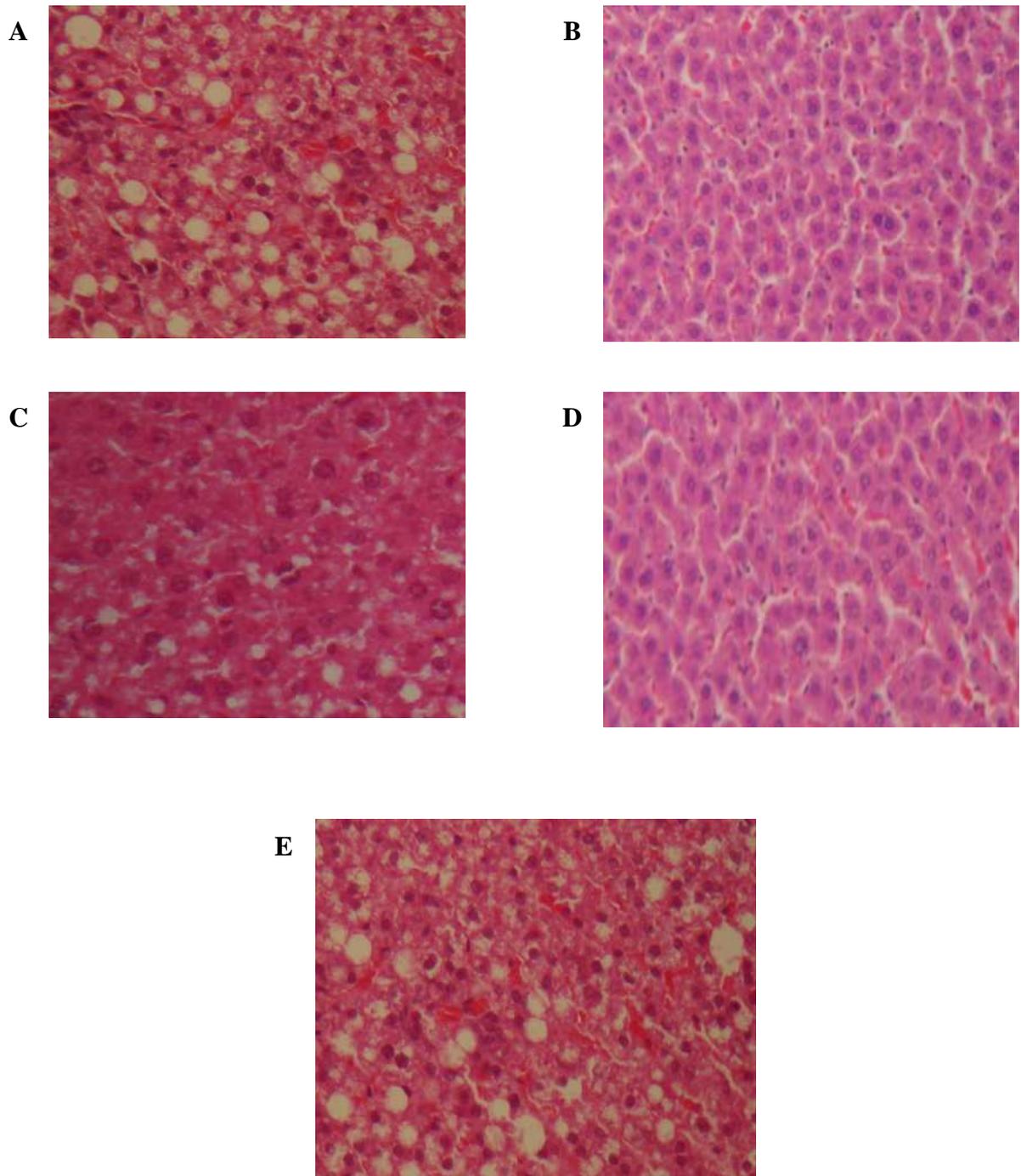


Figura 2. Análise histológica (corada com hematoxilina e eosina) do conteúdo lipídico em amostras de fígados de ratos adultos mantidos com dieta à base de caseína [CC (A) e RC (C)], farinha integral de soja [CS (B) e RS (D)] e dieta hipoprotéica [HP (E)] após o desmame.

A dieta utilizada após o desmame afetou significativamente a taxa de síntese de ácidos graxos *in vivo* ($F_{1,14}=17,43$; $P<0,001$), sendo que os ratos alimentados com dieta à base de farinha de soja (grupos CS e RS) exibiram menor velocidade de síntese de ácido graxo. Ao avaliar a recuperação do estado nutricional o grupo RS apresentou a taxa de síntese de ácidos graxos *in vivo* menor que o grupo HP e similar ao grupo RC (Figura 3).

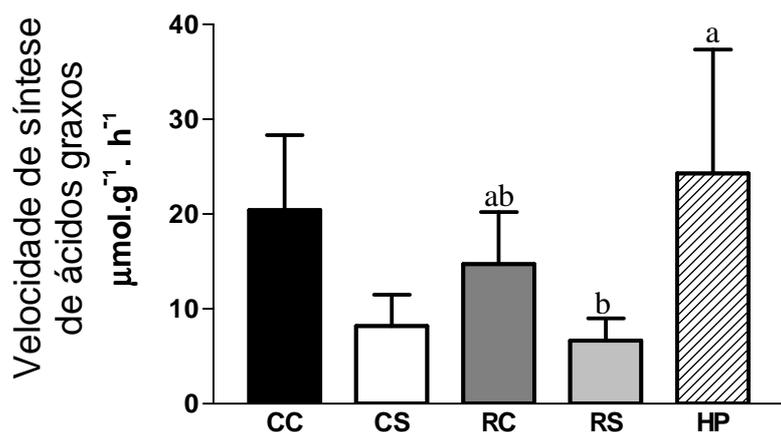


Figura 3. Síntese de ácidos graxos *in vivo* de ratos adultos mantidos com dieta à base de caseína (CC e RC), farinha integral de soja (CS e RS) e dieta hipoprotéica (HP) após o desmame. Valores em médias \pm desvio-padrão de 4 a 5 ratos. Médias com letras minúsculas diferentes são estatisticamente significantes segundo ANOVA a um fator, seguido do Teste LSD.

A atividade da enzima málica foi significativamente influenciada pela dieta ($F_{1,20}=4,84$; $P<0,05$), mas não foi afetada pelo estado nutricional progresso e nem pela interação entre esses dois fatores. Os grupos CS e RS apresentaram atividade da enzima málica significativamente reduzida quando comparados aos grupos CC e RC. Nos animais RS a atividade dessa enzima foi significativamente menor que a dos animais RC e HP (Figura 4A).

A atividade da enzima ATP-citrato liase foi significativamente influenciada apenas pela dieta ($F_{1,20}=8,73$; $P<0,01$). Os animais que consumiram dieta a base de farinha micronizada de soja (CS e RS) tiveram atividade da ATP-citrato liase significativamente menor que os animais alimentados com caseína (CC e RC). O grupo RS apresentou

atividade da ATP-citrato liase significativamente menor que dos grupos RC e HP (Figura 4B).

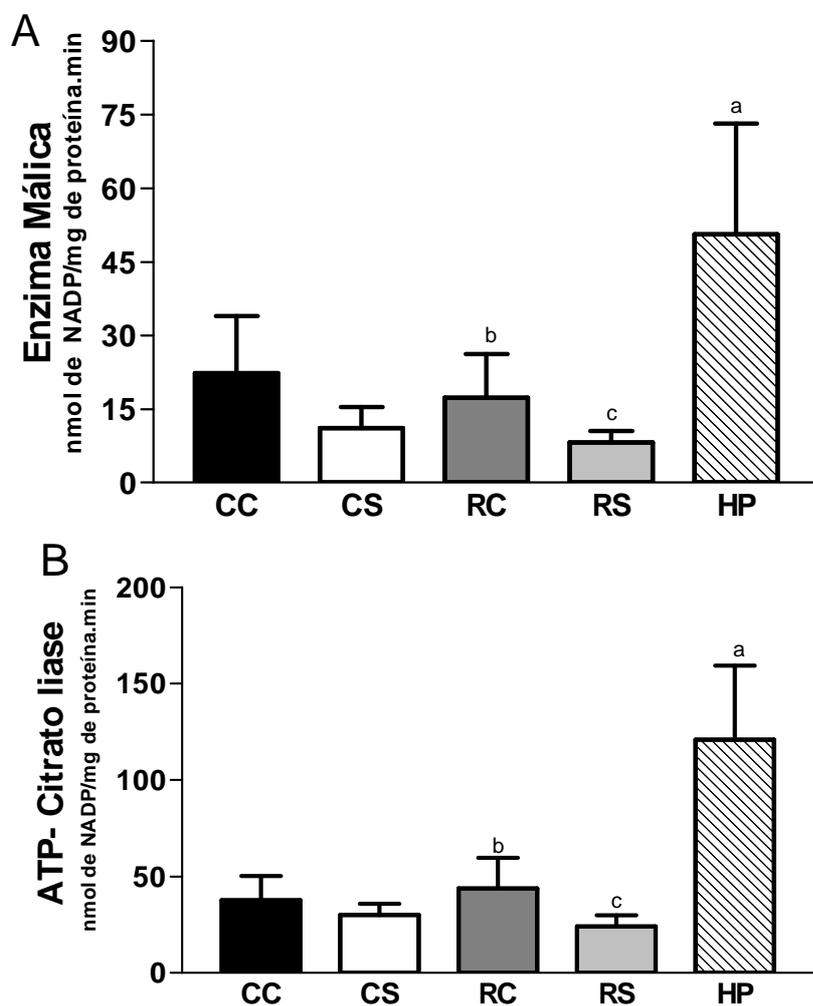


Figura 4. Atividade da enzima málica (A) e ATP-citrato liase (B) de ratos adultos mantidos com dieta à base de caseína (CC e RC), farinha integral de soja (CS e RS) e dieta hipoprotéica (HP) após o desmame. Valores em médias \pm desvio-padrão de 5 a 6 ratos. Médias com letras minúsculas diferentes são estatisticamente significantes segundo ANOVA a um fator, seguido do Teste LSD.

Quando avaliados os fatores de transcrição SREBP-1c (Figura 5A) no final do período experimental, observou-se que a expressão protéica não foi significativamente influenciada pelo estado nutricional progresso, pela dieta utilizada após o desmame, como também pela interação entre esses dois fatores. Entretanto, foi verificado que os grupos RS e RC apresentaram expressão protéica do SREBP-1c significativamente maior que o grupo HP (Figura 5A).

A expressão protéica do PPAR γ foi afetada significativamente apenas pelo tipo de dieta utilizada após o desmame ($F_{1,14}=5,06$; $P<0,05$). Os animais dos grupos CS e RS tiveram expressão do PPAR γ significativamente menor do que os dos CC e RC. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos RS, RC e HP (Figura 5B).

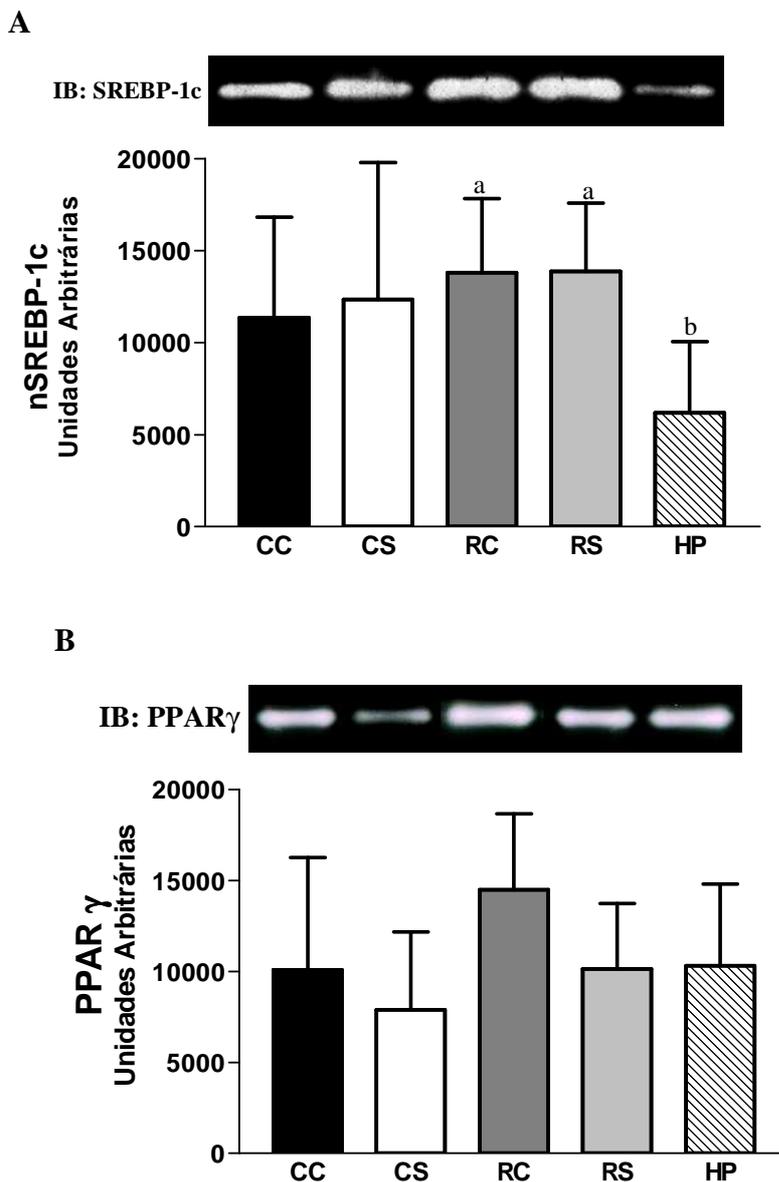


Figura 5. Expressão protéica do fator de transcrição SREBP-1C (A) e PPAR γ (B) hepático de ratos adultos mantidos com dieta à base de caseína (CC e RC), farinha integral de soja (CS e RS) e dieta hipoprotéica (HP) após o desmame. Valores em médias \pm desvio-padrão de 4 ratos. Médias com letras minúsculas diferentes são estatisticamente significantes segundo ANOVA a um fator, seguido do Teste LSD.

Na Tabela 5 são apresentadas as concentrações séricas das aminotransferases hepática, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamyl transferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP). As concentrações séricas de AST não foram significativamente influenciadas pelo estado nutricional prévio, pela dieta utilizada após o desmame ou pela interação entre esses fatores. Entretanto, as concentrações de ALT foram afetadas tanto pelo estado nutricional prévio ($F_{1,20}=8,82$; $P<0,01$) como pela dieta ($F_{1,20}=5,5$; $P<0,05$), mas não ocorreu interação entre esses dois fatores. Assim, os animais recuperados (grupos RS e RC) apresentaram níveis séricos desta enzima significativamente maiores que seus controles (grupos CS e CC) e os animais alimentados com dieta à base de farinha de soja tiveram concentração de ALT maior que os animais alimentados com dieta à base de caseína. Nenhuma diferença foi observada nos grupos RS, RC e HP.

A enzima hepática GGT não foi influenciada pelo estado nutricional prévio ou pela dieta utilizada após o desmame, mas foi afetada pela interação entre esses fatores ($F_{1,20}=4,7$; $P<0,05$). O grupo RS exibiu concentração de GGT significativamente maior que o grupo CS e similar aos grupos CC, RC. Ratos RS apresentaram concentração de GGT significativamente maior que o grupo HP e similar ao grupo RC (Tabela 5).

A fosfatase alcalina foi afetada apenas pelo estado nutricional prévio ($F_{1,20}=18,7$; $P<0,01$). Os animais recuperados (grupos RC e RS) tiveram concentração sérica desta enzima significativamente maiores que os seus controles (CC e CS). Ambos os grupos recuperados (RS e RC) exibiram concentrações séricas de fosfatase alcalina similar e significativamente menores que o grupo HP (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise do dano hepático através da dosagem de enzimas hepáticas como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP) 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
ALT (U/L)	28±6 (5)	43±8 (5)	45±13 (7)	51±12 (7)	54±6 (6)
AST (U/L)	104±25 (5)	163±55 (5)	177±64 (7)	177±54 (7)	208±39 (6)
GGT (U/L)	9±2 ^{AB} (5)	6±4 ^B (5)	8±3 ^{ABab} (7)	10±2 ^{Aa} (7)	6±3 ^b (6)
ALP (U/L)	144±21 (5)	141±16 (5)	178±33 ^b (7)	199±27 ^b (7)	492±66 ^a (6)

Valores em médias ± desvio-padrão do número de ratos em parênteses. Médias com letras maiúsculas diferentes são estatisticamente significantes segundo ANOVA a dois fatores, seguido do Teste LSD. Médias com letras minúsculas diferentes são estatisticamente significantes segundo ANOVA a um fator, seguido do Teste LSD.

VI - DISCUSSÃO

A hiperinsulinemia e a resistência à insulina têm sido apontadas como fatores patogênicos na doença hepática gordurosa não alcoólica. A doença é principalmente associada à obesidade, diabetes e hiperdislipidemias,^{4,97} embora alguns pacientes sejam eutróficos, com glicemia de jejum e tolerância à glicose normais e não mostram nenhuma evidência de aumento das concentrações séricas de lipídios.^{98,99}

Neste estudo, os animais alimentados com dieta à base de soja tiveram baixo peso corporal, glicemia e trigliceridemia normais. O efeito favorável da soja sobre as concentrações séricas de triglicerídeos é notório^{71,74,75,85} e a composição de aminoácidos de sua proteína associada as isoflavonas parecem estar envolvidos no mecanismo redutor das concentrações séricas de lipídios.^{76,100,101}

Tanto a proteína como as isoflavonas da soja, especialmente a genisteína, intervêm sobre o pâncreas endócrino, modulando a secreção de insulina e de glucagon. Esses hormônios produzem efeitos opostos sobre a via biosintética e catabólica no fígado, e contribuem para a manutenção da homeostase da glicose e dos lipídios. Estudos têm mostrado que a proteína da soja, quando consumida por curto período de tempo, reduz as concentrações séricas de insulina, mas não afeta as concentrações de glucagon. Entretanto, quando consumida por longo período de tempo, aumenta as concentrações séricas de glucagon. Em ambas as situações, observam-se baixa razão insulina/glucagon.^{78,101}. Contrariando esta observação, este estudo verificou que o consumo de dieta à base de soja por longo período de tempo aumentou as concentrações séricas de insulina e não alterou as concentrações de glucagon ou a razão insulina/glucagon. As altas concentrações de insulina sérica observadas neste estudo, poderiam ser atribuídas ao efeito da genisteína que aumenta a secreção de insulina por sua habilidade de inibir a proteínas tirosina quinase e ativar a via AMPc-PKA em ilhotas pancreáticas.^{12,102}

É interessante ressaltar, que os animais alimentados com dieta à base de soja mostraram baixo conteúdo de gordura hepática (avaliado por ensaios gravimétricos e histológicos) apesar da moderada hiperinsulinemia, da resistência à insulina apontada pelo método HOMA e reforçada pelas altas concentrações séricas de ALT, uma enzima hepática cujo aumento reflete resistência hepática à insulina e fígado gorduroso.¹⁰³

Para explorar os possíveis mecanismos envolvidos na diminuição do conteúdo de gordura hepática exibida pelos animais alimentados com dieta à base de soja, investigaram-se os níveis de expressão do SREBP-1c e PPAR γ , cujas expressões aumentadas estão positivamente relacionadas a resistência à insulina e associadas ao desenvolvimento do fígado gorduroso clássico.^{38,46,47,49,104,105} Contrário a estudos que mostram a proteína da soja⁷⁵ e a genisteína¹⁰⁶ produzindo repressão do SREBP-1c e a resistência à insulina induzindo o aumento da expressão do SREBP-1c,¹⁰⁵ neste estudo nem dieta à base de soja, nem a resistência à insulina alteraram sua expressão.

Uma explicação adequada para o paradoxo resistência à insulina e expressão inalterada de SREBP-1c e resistência à insulina e expressão do PPAR γ diminuída, é a hiperinsulinemia moderada e a euglicemia, verificadas nos animais alimentados com dieta à base de soja. É importante mencionar que a expressão do SREBP-1c diminuída, promovida pela proteína da soja, tem sido atribuída à diminuída razão insulina/glucagon,⁷⁸ que neste estudo só foi observada em ratos RC e HP quando comparados com ratos RS. Os grupos RC e HP exibiram baixas concentrações séricas de insulina, mas resistência à insulina, razão insulina/glucagon e concentração sérica de glicose similar. Surpreendentemente, apenas os ratos HP apresentaram expressão protéica do SREBP-1c reduzida, porém os ratos RC e HP exibiram acúmulo de gordura hepática equivalente.

Embora a dieta à base de soja não tenha produzido alteração na expressão do SREBP-1c, foi capaz de reduzir a expressão protéica do PPAR γ , que tem como um dos seus

alvos o gene da enzima málica, cujo produto está envolvido na lipogênese.¹⁰⁷ A diminuição da expressão protéica da enzima málica foi verificada em animais alimentados com dieta à base proteína da soja.⁷⁵ Curiosamente, estudos têm mostrado a atenuação do desenvolvimento da esteatose hepática em ratos transgênicos lipodispróficos que não expressam PPAR γ no fígado, independente da presença de hiperinsulinemia ou hiperglicemia.^{48,108}

O armazenamento de gordura no fígado é também regulado pelas atividades integradas de enzimas celulares que catalisam a captação, síntese, oxidação e exportação de lipídios. A insulina é fundamental para biossíntese de triglicerídeos no fígado por modular a atividade de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos. Neste estudo, a atividade das enzimas ATP-citrato liase e málica acompanharam a diminuição da síntese de ácido graxo *de novo* em ratos alimentados com dieta à base de soja. Ascencio *et al.* (2004)⁷⁵ verificaram o efeito redutor da proteína da soja sobre a atividade da enzima málica no fígado de ratos. Entretanto, diferente do que foi observado no presente estudo, aqueles animais mostraram baixa concentração sérica de insulina e da razão insulina/glucagon. Ao contrário do observado em animais alimentados com dieta à base de soja, em ratos mantidos com dieta hipoprotéica, as atividades das enzimas málica e ATP-citrato liase foram aumentadas, resultando em aumento da síntese de ácido graxo *de novo*, apesar da baixa concentração sérica de insulina. Há dois possíveis fatores que poderiam estar contribuindo para o aumento da atividade destas enzimas: a aumentada sensibilidade à insulina e o alto teor de carboidrato da dieta oferecida aos animais HP. Algumas evidências sugerem que a atividade da enzima málica e ATP-citrato liase é estimulada por dietas com altos teores de carboidratos e pela insulina.¹⁰⁹⁻¹¹³ Curiosamente, apesar dos animais alimentados com dieta à base de soja não terem apresentado acúmulo de gordura nos hepatócitos, exibiram elevadas concentrações séricas de ALT, um indicador da saúde hepatocelular.¹⁰³ McClain *et al.* (2006)¹¹⁴ relataram que suplementação crônica de genisteína (500mg/kg/dia) afeta

adversamente a estrutura e a função hepática. No presente estudo a quantidade de genisteína contida na dieta forneceu certamente menos que 500mg/kg/dia. Contudo, não se pode rejeitar a hipótese de que o uso crônico de baixas doses de genisteína tenha provocado *stress* oxidativo, devido ao aumento da β -oxidação de ácidos graxos. Este argumento encontra reforço em vários estudos *in vitro* mostrando que a genisteína aumenta os níveis e a atividade do PPAR α .⁸³⁻⁸⁵ No fígado, o PPAR α tem um papel fundamental no catabolismo de ácidos graxos, por aumentar a regulação da expressão de vários genes envolvidos na oxidação mitocondrial e peroxissomal de ácidos graxos.¹¹⁵ Como consequência, a ativação do PPAR α pode prevenir e diminuir o armazenamento de gordura hepática.⁸⁰ Contudo, a oxidação de ácidos graxos é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) no fígado gorduroso.^{116,117} Algumas consequências do aumento dos ROS incluem depleção de ATP e da dinucleotídeo nicotinamida, danos no DNA, alterações na estabilidade da proteína, a destruição da membrana via peroxidação lipídica, e a liberação de citocinas pró-inflamatórias.¹¹⁸

Finalmente, os resultados do presente estudo mostraram que a dieta à base de soja produziu resistência à insulina, que foi acompanhada por reduzido acúmulo de gordura no fígado, devido, pelo menos em parte a reduzida expressão protéica do PPAR γ e diminuída atividade das enzimas lipogênicas málica e ATP-citrato liase. Contudo, a dieta à base de soja não exerceu efeito protetor da função hepática, se levarmos em consideração a elevada concentração sérica da aminotransferase ALT.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol.* 2002; 122:11649-57.
2. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steato-hepatitis: Mayo Clinic experiences with hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic Proc.* 1980; 55:434-8.
3. James OF, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. *J. Hepatol.* 1998; 29:495-501.
4. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ.* 2005; 172:899-905.
5. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346:1221–31.
6. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 2002; 23:201-29.
7. Azzout-Marniche D, Becard D, Guichard C, Foretz M, Ferre P, Fougelle F. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 2000; 350:389-93.
8. Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab.* 2004; 30:121-38.
9. Koteish A, Diehl AM. Animals model steatosis. *Semin Liver Dis.* 2001; 21:89-104.
10. Latorraca MQ, Reis MA, Carneiro EM, Velloso LA, Saad MJ, Boschero AC, et al. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J. Nutr.* 1998a; 128:1643-9.

11. 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.* 1996; 270:E559–64.
12. 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. *Endocrinology.* 1994; 4:1975-8.
13. Oliveira EA. Homeostase glicêmica de ratos expostos à restrição protéica durante a fase intra-uterina e lactação e recuperados com dieta à base de farinha integral de soja [Dissertação] Cuiabá (MT): Universidade Federal de Mato Grosso – Faculdade de Ciências Médicas; 2006.
14. Gupte P, Amarapurkar D, Agal S, Baijal R, Kulshrestha P, Pramanik S, et al. Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004; 19:854-8.
15. Del Gaudio A, Boschi L, Del Gaudio GA, Mastrangelo L, Munari D. Liver damage in obese patients. *Obes Surg.* 2002; 12:802-4.
16. Angelico F, Del Ben M, Conti R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90:1578-82.
17. Hanley AJG, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D’Agostino RB, Haffner SM. Liver markers and development of the metabolic syndrome. The insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes.* 2005; 54:3140–7.
18. Toshimitsu K, Matsuura B, Ohkubo I, Niiya T, Furukawa S, Hiasa Y, et al. Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrition.* 2007; 23:46–52.

19. Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, et al. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84:1513–7.
20. Kahn SE, Hull RL & Utzschneide KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006; 444:840-6.
21. Komers R, Vrana A. Thiazolidinediones- tools for the research of metabolic syndrome X. *Physiol. Res.* 1998; 47:215-25.
22. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi G, McCullough AJ, et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease to insulin resistance. *Am. J. Med.* 1999; 107:450–5.
23. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology.* 2001; 120:1183-92.
24. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum. Pathol.* 1989; 20:594-8.
25. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology.* 1990; 11:74-80.
26. Benini F, Pigozzi MG, Baisini O, Romanini L, Ahmed H, Pozzi A, et al. Increased serum gamma-glutamyl-transpeptidase concentration is associated with nonalcoholic steatosis and not with cholestasis in patients with chronic hepatitis C. *J. Gastroent. and Hepatol.* 2006; 1-5.
27. Pinto HC, Baptista A, Camilo ME, Valente A, Saragoca A, de Moura MC. Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig. Dis. Sci.* 1996; 41:172-9.

28. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann. Intern. Med.* 1997; 126:137–45.
29. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *Eur. Mol. Biol. Org.* 2001; 2:282-6.
30. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 2004; 114:147–52.
31. Frenkel R. Regulation and physiological functions of malic enzymes. *Curr. Top. Cell. Regul.* 1975; 9:157-81.
32. Bagchi S, Wise LS, Brown ML, Bregman D, Sul HS, Rubin CS. Structure and expression of murine malic enzyme mRNA. Differentiation-dependent accumulation of two forms of malic enzyme mRNA in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:1558-65.
33. Drake RL, Parks WC, Thompson EW. Insulin stimulation of hepatic malic enzyme activity in normal and diabetic rats controlled by different regulatory processes. *J. Biol. Chem.* 1983; 258:6008-10.
34. Yu KT, Benjamin WB, Ramakrishna S, Khalaf N, Czech MP. An insulin-sensitive cytosolic protein kinase accounts for the regulation of ATP citrate-lyase phosphorylation. *Biochem. J.* 1990; 268:539-45.
35. Lane MD, Flores-Riveros JR, Hresko RC, Kaestner KH, Liao K, Janicot M, et al. Insulin-receptor tyrosine kinase and glucose transport. *Diabetes Care.* 1990; 13:565-75.
36. Nakae J, Accili D. The mechanism of insulin action. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 1999; 12:721-31.
37. Assimacopoulos-Jeannet F, Brichard S, Rencurel F, Cusin I, Jeanrenaud B. In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues. *Metabolism.* 1995; 44:233-88.

38. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997; 89:331–40.
39. Shimomura I, Shimano H, Korn BS, Bashmakov Y, Horton JD. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J. Biol. Chem*. 1998; 273:35299-306.
40. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest*. 2002; 109:125–31.
41. Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest*. 1997; 99:846–54.
42. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest*. 1997; 99:2416-22.
43. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol. Cell. Biol*. 1999; 19:5495–503.
44. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman, BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994; 79:1147–56.

45. Schadinger SE, Bucher NL, Schreiber BM, Farmer SR. PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005;288:E1195-205.
46. Edvardsson U, Bergstrom M, Alexandersson M, Bamberg K, Ljung B, Dahllof B. Rosiglitazone (BRL49653), a PPARgamma-selective agonist, causes peroxisome proliferator-like liver effects in obese mice. *J. Lipid. Res.* 1999; 40:1177-84.
47. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, Gavrilova O, et al. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* 2000; 106:1221-28.
48. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, et al. Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J. Clin. Invest.* 2003; 111:737-47.
49. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999a; 96:12737-42.
50. Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, Le Liepvre X, et al. ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol. Cell. Biol.* 1999b; 19:3760-8.
51. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Basmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol. Cell.* 2000; 6:77-86.
52. Shimomura I, Basmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96:13656-61.

53. Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95:5987-92.
54. Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP-1 activates PPAR gamma through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95:4333-7.
55. Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992; 35:595-601.
56. Berney DM, Desai M, Palmer DJ, Greenwald S, Brown A, Hales CN, et al. The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. *J. Pathol.* 1997; 183:109-15.
57. Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol. Neonate.* 1990; 57:107-18.
58. Garofano A, Czernichow P, Bréant B. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia.* 1997; 40:1231-4.
59. 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. Nut.* 1998b; 80:291-7.
60. Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet JJ. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes.* 1991; 40 (Suppl 2):115-20.
61. Cherif H, Reusens B, Dahri S, Remacle C, Hoet JJ. Taurine stimulates insulin release of islets from rat fetus of mothers fed a normal diet but not low protein one. *Diabetologia.* 1996; 39(Suppl 1):A164.

62. Cherif H, Reusens B, Dahri S, Remacle C, Hoet JJ. Islets' insulin secretion is altered in fetus from pregnant rats fed an isocaloric low protein diet. *Diabetes*. 1997; 46(Suppl 1):359A.
63. Burns SP, Desai M, Cohen RD, Hales CN, Iles RA, Germain JP, et al. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J. Clin. Invest.* 1997; 100:1768–74.
64. Desai M, Crowther NJ, Ozanne SE, Lucas A, Hales CN. Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem. Soc. Trans.* 1995; 23: 331-5.
65. Desai M, Byrne CD, Zhang J, Petry C, Lucas A, Hales CN, et al. Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rat dams fed a protein-restricted diet. *Am. J. Physiol.* 1997; 272:G1083-90.
66. Jungermann K, Katz N. Functional specialization of different hepatocytes populations. *Physiol. Rev.* 1989; 69:708-64.
67. Nakanishi M, Watanabe M, Shimada M. Heterogeneous distribution of ¹²⁵I-insulin binding in the liver of fed and fasted mice. *Cell. Mol. Biol.* 1995; 41:137-44.
68. Frank JW, Saslow SB, Camilleri M, Thomforde GM, Dinneen S, Rizza RA. Mechanism of accelerated gastric emptying of liquids and hyperglycaemia in patients with type II diabetes mellitus. *Gastroenterology*. 1995; 109:755–65.
69. Proietto J, Nankervis AJ, Traianedes K, Rosella G, O'Dea K. Identification of early metabolic defects in diabetes-prone Australian Aborigines. *Diabetes. Res. Clin. Pract.* 1992; 17:217–26.
70. Choi GY, Tosh DN, Garg A, Mansano R, Ross MG, Desai M. Gender-specific programmed hepatic lipid dysregulation in intrauterine growth-restricted offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2007; 196:4771-7.

71. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333:276-82.
72. Pelletier S, Kundrat S, Hasler CM. Effects of an educational program on intent to consume functional foods. *J Am Diet Assoc.* 2002; 102:1297-300.
73. Araújo W, Araújo R. Alimentos funcionais. *Ver. Bras. Nutr. Clin.* 1999; 14:237-46.
74. Zhan S, Ho SC. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavonas on the lipid profile. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005; 81:397-08.
75. Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gomez-Perez FJ, Hernandez-Pando R, Tovar AR. Soy protein affects serum insulin and hepatic srebp-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J. Nutr.* 2004; 134:522–9.
76. 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; 36:27–32.
77. Sanchez A, Rubano DA, Shavlik GW, Hubbard RW, Horning MC. Cholesterolemic effects of the lysine/arginine ratio in rabbits after initial early growth. *Arch Latino Am Nutr.* 1988; 38:229–38.
78. Tovar AR, Torre-Villalvazo I, Ochoa M, Elias AL, Ortiz V, Aguilar-Salinas CA, et al. Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J Lipid Res.* 2005; 46:1823–32.
79. Torres N, Torre-Villalvazo I, Tovar AR. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J Nutr Bioch.* 2006; 17:365-73.
80. Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPAR α -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology.* 2003; 38:123–32.

81. Lelliott C, Vidal-Puig AJ. Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28:S22–8.
82. Berge RK, Tronstad KJ, Berge K, Rost TH, Wergedahl H, Gudbrandsen OA, et al. The metabolic syndrome and the hepatic fatty acid drainage hypothesis. *Biochimie*. 2005; 87:15– 20.
83. Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA, Shay N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J. Nutr*. 2003; 133:1238–43.
84. Kim S, Shin HJ, Kim SY, Kim JH, Lee YS, Kim DH, et al. Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPARalpha. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2004; 220:51–8.
85. Lee YM, Choi JS, Kim MH, Jung MH, Lee YS, Song J. Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets. *Nutrition*. 2006; 22:956-64.
86. 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.
87. Wolfson WQ, Cohn C, Calvary F, Ichiba F. Studies in serum proteins. 5. A rapid procedure for the estimation of total protein true albumin, total globulin, alpha globulin and gamma globulin in 1.0 ml of serum. *Am. J. Clin. Pathol*. 1948; 18:723-30.
88. 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; 21:407-75.
89. Ochoa S. Malic enzyme. *Methods Enzymol*. 1955; 1:739-53.

90. Hsu RY, Lardy H. Malic enzyme. *Methods Enzymol.* 1969; 13:230.
91. Srere PA. The citrate cleavage enzyme. I. Distribution and purification. *J. Biol. Chem.* 1959; 234:2544-7.
92. Folch J, Less M, Stanley GA. A simple method for the isolation and purification of total lipids from tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226:497-509.
93. Migliorini RH, Linder C. Oxytocin and lipogenesis by tissue adipose in vitro. *Biochem. Biophys. Acta.* 1966; 125:392-7.
94. Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, et al. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 1997; 100:2858-64.
95. 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.
96. Sokal RR, Rohlf FJ. Assumptions of analysis of variance. In: *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research* (Sokal RR, Rohlf FJ, eds.), W. H. Freeman and Company (NY). 1995; 392-450.
97. Adams LA & Angulo P. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad. Med. J.* 2006; 82:315-22.
98. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterol.* 1994;107:1103-09.
99. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al.. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2001; 50:1844-50.
100. Anderson JJB. Soy phytoestrogens, lipid reductions, and atherosclerosis delay in ovariectomized primates. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:39-40.

101. Tovar AR, Ascencio C, Torres N. Soy protein, casein, and zein regulate histidase gene expression by modulating serum glucagon. *Am. J. Physiol.* 2002; 283: E1016–22.
102. 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.
103. Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002; 51:1889–95.
104. Zhang Y, Yin L, Hillgartner FB. SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACC alpha transcription in hepatocytes. *J. Lipid. Res.* 2003; 44:356– 68.
105. Avramoglu RK, Basciano H & Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistance states. *Clin. Chim. Acta.* 2006; 368:1-19.
106. Shin ES, Lee HH, Cho SY, Park HW, Lee SJ, Lee TR. Genistein downregulates SREBP-1 regulated gene expression by inhibiting site-1 protease expression in HepG2 cells. *J. Nutr.* 2007; 137:1127-31.
107. IJpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid x receptor heterodimer binding to DNA. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:20108–17.
108. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:34268–76.

109. Nepokroeff CM, Lakshmanan MR, Ness GC, Dugan RE, Porter JW. Hormonal regulation of the diurnal rhythm of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in rat liver by insulin, glucagons, cyclic AMP and hydrocortisone. *Arch. Biochem. Biophys.* 1974; 160:387–93.
110. Sugawa-Katayama Y, Morita N. Effect of a high fructose diet on lipogenic enzyme activities of meal-fed rats. *J. Nutr.* 1977; 107:534-8.
111. Drake RL. Effects of various insulin dosages on hepatic lipogenesis. *Anat. Rec.* 1988; 220:300-4.
112. Clarke SD, Armstrong MK, Jump DB. Nutritional control of rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA abundance. *J Nutr.* 1990; 120: 218–24.
113. Boll M, Weber LW, Stampfl A. Nutritional regulation of the activities of lipogenic enzymes of rat liver and brown adipose tissue. *Z Naturforsch C.* 1996; 51:859-69.
114. McClain RM, Wolz E, Davidovich A, Pfankuch F, Edwards JA, Bausch J. Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2006; 44:56-80.
115. Mandard S, Muller M, and Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2004; 61:393–416.
116. Mannaerts GP, Van Veldhoven PP, and Casteels M. Peroxisomal lipid degradation via beta and alpha-oxidation in mammals. *Cell. Biochem. Biophys.* 2000; 32:73–87.
117. Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* 1995; 48:825–34.

118. Bergamini CM, Gambetti S, Dondi, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr. Pharm. Des.* 2004; 10:1611–26.

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](#)