

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE INSULINA E LEPTINA EM  
RATAS PRENHES SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO PROTÉICA E  
SUAS RELAÇÕES COM VARIÁVEIS SINALIZADORAS DE  
OBESIDADE**

**Gláucia da Silva Macêdo**

**CUIABÁ, MT - 2005**

# **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**

**CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE INSULINA E LEPTINA EM  
RATAS PRENHES SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO PROTÉICA E  
SUAS RELAÇÕES COM VARIÁVEIS SINALIZADORAS DE  
OBESIDADE**

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

**Orientanda: Gláucia da Silva Macêdo**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Gaíva Gomes  
da Silva**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Queiroz Latorraca**

**CUIABÁ, MT - 2005**

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Edilson (“in memoriam”) e Laurinda,  
exemplos de família, doação e sabedoria, e que me ensinaram valores  
como honra, responsabilidade, honestidade, dignidade.*

*À minha irmã Laura, por nunca deixar de confiar em mim.*

*Ao meu namorado Valdécio, pelo respeito a um sonho.*

## AGRADECIMENTOS

*À minha orientadora e amiga Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Helena Gaíva Gomes da Silva, por dispor de seu tempo e seu conhecimento, caminhando ao meu lado ao longo do desenvolvimento dos trabalhos.*

*À Prof<sup>a</sup> Dra. Márcia Queiroz Latorraca, co-orientadora e amiga, por sua constante boa vontade, disposição e pela imprescindível colaboração em todos os momentos do processo.*

*Às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> Nair Honda Kawashita, Marise Auxiliadora Reis e Maria Salete Ferreira Martins pelas importantes contribuições ao trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Francisco José Dutra Souto pelo profissionalismo e dedicação ao Curso de Pós-Graduação.*

*Aos Professores do Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos Roberto V. Veloso, Vanessa C. Arantes; às bolsistas Andressa, Cristiane, Noeli, Letícia, Bárbara e Talita; e à minha prima Marília Gimenes, pelo auxílio prestado.*

*À Loanda e Elisângela, colegas do mestrado, pelo companheirismo constante.*

*Aos Prof<sup>os</sup> Drs. Antônio C. Boschero e Everardo M. Carneiro do Departamento de Fisiologia e Biofísica - UNICAMP, pela parceria na determinação das análises.*

*À Prof<sup>a</sup> MSc Maria Aparecida Rodrigues da Silva Barbosa, minha tia, por não se cansar de me incentivar.*

*Aos amigos Marciane, Cristiane e Celso, por tudo isso e muito mais.*

*Em especial a Deus, pela existência dessas pessoas em minha vida.*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>I – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>II – REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>III – JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>23</b>
<b>IV – OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
4.1 – Geral .....	25
4.2 – Específicos .....	25
<b>V – MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
5.1. Animais e dietas .....	27
5.2. Procedimentos Experimentais.....	29
5.2.1. Determinação do peso corporal .....	29
5.2.2. Determinação do consumo alimentar .....	29
5.2.3. Obtenção de amostras sanguíneas e teciduais.....	30
5.2.4. Determinação da composição corporal .....	30
5.2.5. Determinações Bioquímicas .....	31
5.2.5.1 Proteínas Totais .....	31
5.2.5.2. Albumina .....	32
5.2.5.3 Glicose .....	32
5.2.5.4. Insulina .....	32
5.2.5.5. Resistência à insulina.....	34
5.2.5.6. Leptina .....	34
<b>VI – ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>	<b>37</b>
<b>VII – RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>VIII – DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Composição das dietas normal e hipoproteica (g/Kg).....	28
---	----

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Peso corporal inicial e final (g), variação de peso (g), consumo alimentar absoluto (g) e relativo (g/100g), de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoproteica (HNP e HP).....	39
Tabela 2. Concentrações séricas de albumina (g/dl), proteínas totais (g/dl), glicose (mg/dl), insulina (ng/ml), leptina (pg/ml) e índice de resistência à insulina (HOMA-IR) de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoproteica (HNP e HP).....	40
Tabela 3. Peso fresco em valores absolutos e relativos dos tecidos adiposos branco retroperitoneal (RET) e gonadal (GON), e do tecido adiposo marrom (TAM) de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoproteica (HNP e HP).....	42
Tabela 4. Composição da carcaça (g, g/100g de peso da carcaça) de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoproteica (HNP e HP).....	44
Tabela 5. Energia da carcaça, linha de base, ganhos de energia como lipídio, como proteína e ganho de energia total (kJ) de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoproteica (HNP e HP).....	45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Relação entre o lipídio da carcaça (A), o tecido adiposo retroperitoneal (B), o tecido adiposo marrom (C), tecido adiposo gonadal (D) e leptina sérica de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoproteica (HNP e HP).....	43
---	----

## RESUMO

Alterações dos perfis séricos de insulina e de leptina, do consumo alimentar e do padrão metabólico que resultam em aumento de adiposidade são observadas na gestação e na restrição protéica, de forma isolada. Avaliou-se as concentrações séricas de insulina e leptina e suas relações com algumas variáveis sinalizadoras de obesidade em ratas prenhes (14º dia), submetidas à restrição protéica, divididas em quatro grupos: controle não prenhe (CNP) e prenhe (CP), alimentadas com dieta controle (17% de proteína); e hipoproteico não prenhe (HNP) e prenhe (HP), alimentadas com dieta restrita em proteína (6%). Independente da dieta recebida, ratas prenhes (CP e HP) exibiram maior ingestão alimentar, maior ganho de peso corporal e maior peso final, comparadas às não prenhes (HNP e HP). A prenhez (CP e HP) reduziu a glicemia e a proporção do depósito de tecido adiposo branco gonadal, enquanto a restrição protéica (HNP e HP) diminuiu a proporção de gordura da carcaça. Os pesos absoluto e relativo do tecido adiposo marrom foram aumentados nas duas situações. As concentrações séricas de leptina e insulina foram similares e não se correlacionaram com a ingestão alimentar. A insulina se correlacionou significativamente com o lipídio da carcaça, em ratas HNP e HP, enquanto a leptina se correlacionou com o peso dos tecidos adiposos gonadal e retroperitoneal apenas em CP e HP. Concluiu-se que a restrição protéica durante a prenhez não alterou os perfis séricos dos sinais de adiposidade e nem seus efeitos sobre o comportamento alimentar e a adiposidade, possivelmente devido ao tempo de exposição à injúria.

**Palavras-chaves:** dieta hipoprotéica, leptina sérica, insulina sérica, consumo alimentar, adiposidade corporal, prenhez.

## ABSTRACT

Changes in serum insulin and leptin profile, food intake and metabolic pattern, resulting in enhanced adiposity is commonly observed during pregnancy and protein restriction. It was evaluated serum leptin and insulin levels and its correlations with some predictive obesity variables in pregnant rats (14<sup>th</sup> day) under low protein diet: control non-pregnant (CNP) and pregnant (CP) groups, fed a control diet (17% protein), and low protein non-pregnant (LPNP) and pregnant (LPP) groups, fed a low-protein diet (6%). Pregnancy increased food intake, independently of the protein content. As a result, CP and LPP exhibited significant gain of weight and final weight, related to non-pregnant rats (CNP and LPNP). In CP and LPP the glycemia and the relative weight gonadal adipose tissue were reduced, while the protein restriction (LPNP and LPP) reduced the relative weight of lipid in carcass. In both situations the absolute and relative weight of brown adipose tissue was increased. Serum insulin and leptin levels were similar among groups and did not correlate with food intake. But it was verified a positive relationship between serum insulin levels and fat carcass depots in LPNP and LPP, while in CP and LPP serum leptin correlated with weight of gonadal and retroperitoneal adipose tissues. These results allow conclude that protein restricted diet during pregnancy did not alter the serum profile of adiposity signals and their effects on food intake and adiposity, probably due to the time of exposition to insult.

**KEY WORDS:** low protein diet, serum leptin, serum insulin, food intake, body adiposity, pregnancy.



## I – INTRODUÇÃO

A prevalência de obesidade está aumentando na maioria dos países, mesmo naqueles que apresentam altas taxas de subnutrição.<sup>1,2</sup> Atualmente, obesidade, doença cardiovascular e diabetes mellitus tipo 2, são prevalentes na população adulta em desvantagem socioeconômica de países em desenvolvimento. No Brasil, alguns estudos de prevalência mostraram um aumento epidêmico de obesidade, principalmente entre mulheres pertencentes a classes sociais mais desfavorecidas.<sup>3-6</sup> Embora a melhoria nas condições econômicas em algumas famílias possa explicar tais tendências, é possível que outros fatores também sejam importantes.<sup>7</sup>

A gravidez é caracterizada por hiperfagia<sup>8,9</sup>, diminuição da termogênese<sup>10</sup> e adaptações funcionais das células gordurosas, desencadeando um aumento na massa de tecido adiposo durante a fase inicial, seguido por um declínio na fase final.<sup>8,11</sup> No estágio inicial da gestação, a síntese de ácidos graxos a partir da glicose está aumentada e a via lipogênica predomina, enquanto que no estágio final, a via lipolítica está mais ativa.<sup>12</sup> Esta condição anabólica líquida presente na primeira fase da gestação parece ser dirigida pela insulina, o mais eficiente hormônio anabólico, e sua secreção e concentração pancreáticas estão aumentadas desde o início da gravidez.<sup>13,14</sup>

Dietas com baixa quantidade de proteína induzem à hiperfagia<sup>15</sup>, acompanhada por aumento do metabolismo basal<sup>16</sup> e da termogênese adaptativa provocada pela dieta. Esta última está associada com aumento da massa e da atividade do tecido adiposo marrom (TAM)<sup>17</sup>, devido à estimulação do sistema nervoso simpático (SNS).<sup>16</sup> Embora ocorra elevação do gasto energético, observa-se também aumento do conteúdo de gordura corporal<sup>15,18,19</sup>, possivelmente devido a uma adaptação positiva que permite estocar como lipídio parte do excesso do carboidrato ingerido em relação à baixa

concentração de proteína.<sup>16</sup> O aumento da atividade do SNS parece contribuir para a redução da secreção de insulina estimulada pela glicose<sup>20</sup>, compensada pelo aumento da tolerância à glicose e da ação da insulina, vistas na restrição protéica.<sup>21,22,23</sup>

Tal como a insulina, a leptina está envolvida na modulação do balanço energético pela inibição do consumo alimentar e pelo aumento do gasto energético mediado pela ativação do SNS.<sup>24</sup> A concentração plasmática e a ação da leptina parecem ser alteradas por dietas hipoprotéicas<sup>15</sup> e pela gravidez.<sup>25</sup> A coexistência de consumo de dietas hipoprotéicas e gestação, comumente encontrada em países subdesenvolvidos, pode alterar o perfil sérico e a ação desses hormônios contribuindo para a promoção da obesidade materna a curto e longo prazo.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de dieta restrita em proteína ao final da fase anabólica da gravidez, sobre as concentrações séricas de leptina e insulina, e o envolvimento desses hormônios no comportamento alimentar e no acréscimo de gordura corporal materna.



## II – REVISÃO DE LITERATURA

Embora haja consenso que fatores de origem genética e ambiental estejam associados ao desenvolvimento da obesidade<sup>26</sup>, os mecanismos envolvidos na sua gênese ainda não foram elucidados em sua totalidade.

A obesidade resulta do desequilíbrio entre ingestão alimentar e gasto energético e/ou de alterações no metabolismo e na utilização de substratos.<sup>27</sup> De forma geral, o peso corporal tende a permanecer estável tanto em magros como em obesos. Esta estabilidade relativa suscitou a hipótese de que a adiposidade corporal possa ser regulada por um sistema de *feedback* negativo, onde a ingestão alimentar é controlada pelo conteúdo de gordura corporal, mantendo constantes as reservas energéticas.<sup>28</sup>

O sistema nervoso central (SNC) é o principal sítio de integração de sinais envolvidos no controle da homeostase energética.<sup>29</sup> Neurotransmissores, neuropeptídeos, citocinas, hormônios, nutrientes e metabólitos, são alguns dos sinais que interferem na ingestão alimentar e no gasto energético.<sup>24</sup>

Alguns sinais são liberados pelas células do trato gastrintestinal (TGI), em resposta a nutrientes e outros constituintes do quimo ou alimentos parcialmente digeridos.<sup>30-33</sup> As secreções dessas células enteroendócrinas são principalmente peptídeos, que atingem a corrente sangüínea e agem como hormônios em tecidos específicos,<sup>30,34-38</sup> e também se ligam a receptores específicos localizados em aferentes vagais que inervam o TGI.<sup>34,39</sup> A ativação do nervo vago produz um estímulo cerebral que inicia reflexos que controlam a função gastrintestinal e envia sinais a outras áreas do cérebro afetando a saciedade.<sup>29</sup> Alguns sinais químicos parecem também agir diretamente no SNC ao se ligarem a receptores específicos.<sup>29</sup> Os peptídeos intestinais controlam o volume, o início e o término das refeições e são coletivamente

denominados “sinais de saciedade” ou “sinais de curto prazo”. Existem, pelo menos, dez ligantes com tal função: colecistoquinina (CCK), amilina, peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1), peptídeo tirosina-tirosina (PYY), apolipoproteína-IV (A-IV), enterostatina, bombesina, oxintomodulina, leptina gástrica e grelina.<sup>29</sup> Dos sinais citados, apenas a grelina aumenta a ingestão alimentar, sendo os demais promotores da saciedade.<sup>40,41</sup>

Além de liberar sinais químicos, o TGI é dotado de mecano-receptores (receptores de estiramento), sensíveis ao volume intestinal e à pressão no lúmen.<sup>42,43</sup> Uma vez estimulados pelo aumento da pressão e do volume gastrointestinal, os aferentes vagais enviam sinais a áreas cerebrais que determinam o término das refeições.<sup>44,45</sup> Assim, no TGI são gerados sinais transmitidos por vias neurais (aferentes vagais) ou humorais (hormônios) que se ligam a receptores periféricos e do SNC.<sup>29</sup>

Embora afetem a ingestão alimentar durante as refeições, os sinais de saciedade têm influência limitada sobre a adiposidade e o peso corporal. Existem outros sinais denominados “de longo prazo” ou “de adiposidade” que interferem no consumo alimentar e no gasto energético, mantendo a adiposidade e o peso corporal dentro de uma estreita faixa de variação.<sup>46</sup> A insulina e a leptina são consideradas, até o momento, os principais sinais de adiposidade. Para que um composto seja considerado um “sinal de adiposidade” este deve ser secretado em proporção ao conteúdo de gordura corporal, ter acesso a áreas específicas do sistema nervoso, influenciar a ingestão alimentar e o peso corporal de um modo previsível.<sup>28</sup>

O papel da insulina como o principal hormônio modulador da glicemia é conhecido desde a primeira metade do século passado. A insulina tem também uma importante função na regulação do armazenamento e utilização de energia no tecido adiposo. Após uma refeição, o aumento da concentração sérica de insulina promove a

estocagem de triglicerídeos no tecido adiposo. A insulina inibe a lipólise por um mecanismo que envolve a enzima fosfodiesterase-3B (PDE-3B), diminuindo a atividade da proteína quinase A (PKA) e da lipase hormônio sensível (LHS), resultando em menor hidrólise de triglicerídeos.<sup>47,48</sup> Simultaneamente, a formação de triglicerídeos a partir de acil-CoA e glicerol fosfato é estimulada via acetil-CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (AGS).<sup>49</sup> A variação nos níveis plasmáticos de insulina ocorre de forma dose-dependente à adiposidade corporal, ou seja, a insulina plasmática aumenta sob balanço energético positivo e diminui com balanço negativo.<sup>50</sup>

O efeito da insulina sobre a ingestão alimentar e o gasto energético foram identificados na década de 1970.<sup>51,52</sup> Numerosas evidências têm reforçado o papel da insulina no controle da homeostase energética: 1) presença de receptores de insulina em regiões do cérebro envolvidas no controle da ingestão alimentar e do gasto energético<sup>53,54,55,56</sup>; 2) administração de insulina exógena diretamente no hipotálamo, especialmente no núcleo arqueado ou no terceiro ventrículo, resulta em redução do consumo alimentar e do peso corporal de maneira diretamente proporcional à quantidade administrada, com esse efeito sendo observado por várias horas<sup>57,58,59,60</sup>; 3) administração de anticorpos anti-insulina no cérebro, provocando aumento do consumo alimentar e conseqüente ganho de peso<sup>28</sup>; 4) redução da via intracelular de sinalização de insulina no hipotálamo ventral em camundongos resultando em hiperfagia e obesidade<sup>61</sup>; 5) infusão de insulina no ventrículo cerebral de ratos diabéticos insulino-pênicos em dose suficiente para manter a homeostase da insulina e da glicose, e conseqüente redução em 50% no consumo alimentar.<sup>61</sup>

A descoberta da leptina como sinal de adiposidade foi descrita mais recentemente, na década de 1990<sup>63</sup>, embora a sua existência tenha sido inferida mais de 25 anos antes, por meio de estudos de parabiose com camundongos.<sup>64</sup> A leptina é

secretada principalmente pelos adipócitos, em proporção direta à quantidade de gordura corporal estocada<sup>24,28,65</sup>, e é transportada através da barreira hemato-encefálica para dentro do cérebro. Estudos envolvendo administração de leptina intra-cerebral mostraram diminuição na ingestão alimentar e do peso corporal.<sup>66,67</sup>

Assim como a insulina, a leptina também está relacionada com o aumento do gasto energético.<sup>68,69</sup> O gasto energético é regulado pela ativação do sistema nervoso simpático<sup>70,71</sup>, e estudos recentes indicam que os efeitos inibitórios da leptina sobre o consumo alimentar são mediados pela ativação fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase)<sup>72</sup>, que também participa da via de transdução do sinal da insulina. As ações comuns da insulina e da leptina no SNC são mediadas por essa via, regulando o comportamento alimentar e a homeostase metabólica.<sup>23,28,73</sup> Duas populações de neurônios presentes no núcleo arqueado hipotalâmico controlam essa integração.<sup>74</sup> Um circuito inibe a ingestão alimentar e aumenta o gasto energético através da expressão de neuropeptídeos pro-opiomelanocortina (POMC) e do transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (CART)<sup>75,76</sup> e o outro estimula a ingestão alimentar e reduz o gasto energético, via expressão do neuropeptídeo Y (NPY) e do peptídeo agouti-relacionado (AgRP).<sup>77,78</sup> Estes sinais interagem por vias opostas, porém paralelas.<sup>28</sup>

As concentrações séricas de leptina e de insulina são influenciadas pela ingestão energética e pelos macronutrientes da dieta. A redução de proteínas na dieta resulta em diminuição da insulina<sup>79</sup> e na elevação da leptina sérica<sup>15</sup>. Contudo, parece não existir consenso em relação ao efeito de dietas hipoprotéicas sobre o consumo alimentar. Alguns estudos têm mostrado aumento da ingestão absoluta<sup>18,19,80,81</sup> e relativa ao peso corporal<sup>17,82</sup>, enquanto outros mostram redução<sup>83,84</sup>, ou nenhuma alteração<sup>85</sup> dessa variável. Essas variações parecem ocorrer em função de pelo menos dois fatores: grau de privação protéica e idade do animal. Quando se observa hiperfagia, esta tem sido

atribuída a: 1) mecanismo de compensação na tentativa de alcançar os requerimentos de proteína para manter a massa corpórea magra<sup>86</sup>; 2) alteração do metabolismo de nitrogênio e de aminoácidos no cérebro<sup>15</sup>; 3) superexpressão do gene de neuropeptídeo Y no hipotálamo basomedial<sup>87</sup>; 4) resistência à leptina.<sup>15</sup> Animais submetidos à restrição protéica apresentam proporcionalmente, maior concentração de gordura corporal<sup>15,85</sup>, atribuído à hiperfagia<sup>86</sup> e ao aumento da sensibilidade do tecido adiposo à insulina.<sup>88</sup> Segundo Rothwell & Stock<sup>17</sup> essas mudanças na eficiência metabólica parecem ser resultado de um aumento adaptativo da termogênese induzida pela dieta, associado ao aumento da atividade do tecido adiposo marrom.

A gravidez também é uma situação caracterizada por alteração nas concentrações séricas de insulina<sup>12</sup> e leptina<sup>25</sup>, no comportamento alimentar, no gasto energético e na composição corporal.<sup>89</sup>

Na primeira metade da gravidez ocorre acúmulo de gordura corporal que reflete a predominância da via lipogênica, e na segunda metade prevalece a via lipolítica resultando na diminuição da adiposidade.<sup>12,11,90</sup> A condição anabólica presente durante a primeira fase da gestação parece ser dirigida pela insulina, que é o mais eficiente hormônio anabólico. A sua concentração pancreática, secreção e ação periférica estão aumentadas nesta fase.<sup>13,14,91,92,93</sup> Esta situação é modificada durante a fase final da gravidez, quando a resistência à insulina e a hiperinsulinemia estão presentes.<sup>94</sup>

A concentração sérica de leptina varia em função da fase gestacional atingindo, em roedores, o pico entre o 12º e o 19º dias, seguido de um declínio pronunciado chegando até valores semelhantes aos de não prenhes por volta do 21º dia de prenhez.<sup>95</sup> Essa flutuação coincide com a variação da adiposidade corporal. A prenhez parece induzir resistência à leptina, a julgar pela elevada concentração desse hormônio associada ao padrão de consumo alimentar normal ou aumentado.<sup>96,97</sup> Acredita-se que

este estado de resistência ao hormônio ocorra para garantir a provisão de energia suficiente para as demandas de rápido crescimento fetal no período final da gestação.<sup>98</sup>

A maioria dos estudos disponíveis enfoca o comportamento hormonal associado à prenhez em condições da oferta de uma dieta adequada, sendo que poucos relatos abordam o papel da leptina e insulina na prenhez sob situação nutricional adversa, como na restrição protéica.

**JUSTIFICATIVA**

---

### III – JUSTIFICATIVA

A prevalência de obesidade está aumentando na maioria dos países, mesmo naqueles que tradicionalmente apresentam altas taxas de subnutrição<sup>99</sup>, fato este que contraria a clássica teoria da gênese da obesidade relacionada unicamente à ingestão excessiva de alimentos e à genética. Tal constatação, associada à observação de que este distúrbio acomete grupos populacionais onde a escassez de alimentos ou de nutrientes específicos continua ocorrendo, motiva a busca de outros fatores causais. Embora a melhora das condições sócio-econômicas possa explicar parcialmente esse fenômeno denominado “transição nutricional”<sup>100,101,102,103,104</sup>, outros fatores merecem ser investigados.<sup>7</sup>

No Brasil a prevalência de obesidade tem acompanhado a tendência de aumento mundial, especialmente em mulheres pertencentes a grupos sociais menos favorecidos.<sup>4,5,6</sup> Situações específicas como a gravidez e o consumo de dietas restritas em proteínas, onde se observam alterações no comportamento alimentar, no gasto energético e na composição corporal e favorecem o aumento da adiposidade, poderiam explicar este aumento.

A maioria dos estudos tem avaliado o efeito da restrição protéica durante a prenhez no surgimento de doenças metabólicas na prole. Poucos são os relatos das conseqüências do agravo nutricional durante a prenhez no organismo materno.

Assim, um estudo experimental avaliando a influência da restrição protéica durante a prenhez, especialmente na fase anabólica, sobre o perfil sérico dos hormônios sinalizadores da adiposidade, leptina e insulina, relacionando-os com algumas variáveis preditoras da obesidade, poderá contribuir para se conhecer as razões do aumento da prevalência dessa enfermidade.

**OBJETIVOS**

---

## **IV – OBJETIVOS**

### **4.1 – Geral**

- Avaliar as concentrações séricas de insulina e leptina e suas relações com variáveis sinalizadoras de obesidade em ratas prenhes submetidas à restrição protéica.

### **4.2 – Específicos**

- Analisar as concentrações séricas de insulina e leptina em ratas prenhes submetidas à restrição protéica.
- Determinar a ingestão alimentar, a composição da carcaça, o peso corporal e dos tecidos adiposos branco e marrom.
- Correlacionar a insulinemia e a leptinemia com o consumo alimentar, o peso corporal e a adiposidade em ratas prenhes submetidas à restrição protéica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

## V - MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos (LABA) do Departamento de Alimentos e Nutrição (DAN), da Faculdade de Nutrição (FANUT), da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Todos os experimentos foram dirigidos por princípios de boas práticas de laboratório e procedimentos científicos, de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), adotadas pela UFMT.<sup>105</sup>

### 5.1. Animais e dietas

Vinte e três ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade Albinos, ordem *Rodentia Mammalia*, família *Muridae*) adultas com 90 dias, foram fornecidas pelo biotério central da UFMT, Cuiabá – Brasil. O acasalamento foi feito abrigo machos e fêmeas durante a noite, em gaiolas de polipropileno, medindo 37,0 x 31,0 x 16 cm com tampa de metal galvanizado, tendo livre acesso à água e a ração comercial (LABINA). A prenhez foi confirmada através do esfregaço vaginal e verificação da presença de espermatozóides. As ratas não prenhes e prenhes foram separadas em gaiolas individuais e mantidas em ambiente a 24±1°C, umidade relativa de 55% e um ciclo claro de 6:00h às 18:00h, com dieta e água *ad libitum*, do primeiro até o 14º dia de prenhez.

Durante o período experimental os animais receberam dois tipos de dietas isocalóricas (15,74 kJ/g) especificadas no Quadro 1: dieta controle com 17% de proteína, segundo as recomendações do American Institute of Nutrition para roedores,

nas fases de crescimento, gravidez e lactação (AIN93-G) ou dieta hipoprotéica com 6% de proteína AIN-93 modificada.<sup>106</sup>

Quadro 1. Composição das dietas controle e hipoprotéica

Ingredientes	Dieta controle	Dieta hipoprotéica
	(17% proteína)	(6% proteína)
	g/kg	
Caseína (84% proteína)	202,0	71,5
Amido de milho	397,0	480,0
Amido de milho dextrinizado	130,5	159,0
Sacarose	100,0	121,0
Óleo de soja	70,0	70,0
Fibra	50,0	50,0
Mistura de minerais (AIN-93G)*	35,0	35,0
Mistura de vitaminas (AIN-93G)*	10,0	10,0
L-cistina	3,0	1,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5

\* Reeves et al. (1993).

Foram formados quatro grupos de ratas de acordo com os estados fisiológico e nutricional:

- Controle não prenhe (CNP) - ratas com confirmação de não prenhez, alimentadas com dieta normoprotéica (17% de proteína) durante o período experimental;
- Controle prenhe (CP) - ratas prenhes, alimentadas com dieta normoprotéica (17% de proteína), até o 14º dia de gravidez;

- Hipoprotéico não prenhe (HNP) - ratas com confirmação de não prenhez, alimentadas com dieta hipoprotéica (6% de proteína) durante o período experimental;
- Hipoprotéico prenhe (HP) - ratas prenhes, alimentadas com dieta hipoprotéica (6% de proteína), até o 14º dia de gravidez.

Todas as dietas foram elaboradas na forma de pó, sendo os ingredientes pesados (balança digital marca Marte, modelo A 500, com precisão de 0,01 g, e balança analítica, com precisão de 0,0001 g), peneirados (malha 200) e homogeneizados. As dietas foram preparadas em quantidade suficiente para todo o período experimental, acondicionadas em recipientes de polipropileno, hermeticamente fechados e armazenadas a 5 °C.

## **5.2. Procedimentos experimentais**

### **5.2.1. Determinação do peso corporal**

O peso corporal foi registrado três vezes por semana. As pesagens também foram efetuadas em balança digital, com precisão de 0,01g.

### **5.2.2. Determinação do consumo alimentar**

As medidas de consumo alimentar foram realizadas três vezes por semana. A ingestão alimentar absoluta (g) foi calculada pela diferença obtida entre a quantidade de ração oferecida e as sobras.

Tanto para o cálculo da ingestão, como para o da deposição de energia (composição da carcaça), foram aplicados os seguintes fatores: 16,74 kJoule por grama para proteínas e carboidratos e 37,67 kJoule por grama para gorduras.

### **5.2.3. Obtenção de amostras sanguíneas e teciduais**

No final do experimento, após jejum noturno, os animais foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas. O soro foi separado, sendo armazenadas alíquotas a -20°C para posterior determinação das concentrações séricas de insulina e leptina, e o restante encaminhado para determinações bioquímicas (proteínas totais, glicose e albumina).

Após laparotomia mediana e evisceração, as carcaças foram pesadas e armazenadas para determinação da composição corporal. Os tecidos adiposos branco retroperitoneal (RET) e gonadal (GON) e o tecido adiposo marrom (TAM) foram pesados, sendo os resultados expressos em valor absoluto (grama) e relativo (grama/100g de peso corporal).

### **5.2.4. Determinação da composição corporal**

Após a evisceração, as carcaças foram mantidas em estufa com temperatura entre 80 e 85°C, até a obtenção de peso constante. Por diferença entre o peso fresco e o peso seco da carcaça, foi obtido o teor de água. Da carcaça desidratada extraiu-se a gordura com éter de petróleo e foi determinado o teor de gordura (em gramas) pela diferença entre o peso da carcaça desidratada e o peso desta desengordurada. Após este processo, a carcaça foi triturada sendo uma alíquota pesada e incinerada em mufla a 550

°C até a obtenção do peso constante, sendo obtida a fração cinza ou resíduo mineral fixo em gramas. O teor de proteína foi calculado pela subtração dos conteúdos de água, gordura e cinzas da carcaça. Os resultados foram também expressos em percentagens do peso da carcaça.<sup>107</sup>

O ganho de energia total da carcaça, bem como os ganhos de energia como lipídios e como proteínas, foram obtidos pela diferença entre o teor de energia total de cada nutriente da carcaça em relação à linha de base (composição da carcaça no início do experimento). A linha de base foi estimada usando as proporções da composição final do grupo controle não prenhe, que não recebeu qualquer insulto, sobre o peso estimado inicial da carcaça. O peso estimado inicial da carcaça foi obtido subtraindo do peso inicial de cada rata, o percentual de peso de vísceras do grupo não prenhe, retiradas no ato do sacrifício.<sup>15</sup>

## **5.2.5. Determinações bioquímicas**

### **5.2.5.1. Proteínas totais**

A concentração de proteínas totais séricas foi determinada, usando o método do reativo de biureto modificado, utilizando *kits* comercialmente disponíveis, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro modelo 395, marca Micronal, em comprimento de onda de 545 nm e os resultados expressos em g/dL.<sup>108</sup>

#### 5.2.5.2. Albumina

A determinação de albumina sérica foi realizada pelo método colorimétrico do verde de bromocresol tamponada em pH 3,8. Foram adicionados 0,01 mL de soro, 1mL do reativo de cor. Foram utilizados *kits* comercialmente disponíveis e a leitura foi realizada a 630 nm e os resultados expressos em g/dL.<sup>109</sup>

#### 5.2.5.3. Glicose

A glicemia foi determinada pelo método enzimático da glicose oxidase-peroxidase, utilizando *kits* comercialmente disponíveis. A 1,0 mL de reativo contendo fenol 2,5 mM, 4 (p-benzoquinona monoimino) fenazona 1,14 mM, tampão Tris 0,04 mM, glicose-oxidase 2,7 U/mL, foram adicionados 0,01 mL de soro e incubados por 15 minutos em banho-maria a 37°C. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 505 nm e os resultados apresentados em mg/dL.<sup>110</sup>

#### 5.2.5.4. Insulina

A insulina sérica de jejum foi determinada por radioimunoensaio, de acordo com o método descrito por Scott e colaboradores.<sup>111</sup> Foram transferidas alíquotas de 0,1 mL das amostras desconhecidas (em duplicata), as quais receberam 0,2 mL de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com <sup>125</sup>I (traçador) em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCL 0,9% e albumina 0,5%. Em seguida foram preparados os seguintes controles:

a) 3 tubos (totais) que receberam somente 0,2 mL do tampão fosfato contendo insulina marcada  $^{125}\text{I}$  para averiguação da radiação máxima;

b) 3 tubos (ligação não específica) que receberam somente 0,2 mL do tampão fosfato contendo insulina marcada  $^{125}\text{I}$  e 0,1 mL de tampão fosfato, para determinar possíveis interferências no ensaio pelos componentes do tampão;

c) 3 tubos (referência) com 0,2 mL de solução tampão fosfato contendo insulina marcada  $^{125}\text{I}$  e anticorpo anti-insulina e 0,1 mL de tampão fosfato, constituindo assim o zero de insulina da curva padrão.

Em seguida preparou-se, também em triplicata, uma série de tubos (curva padrão), contendo 0,1 mL de insulina conhecida nas seguintes concentrações: 0,02; 0,039; 0,078; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; e 5,0 ng/mL. Cada tubo dessa série recebeu também 0,2 mL de solução tampão fosfato contendo insulina marcada  $^{125}\text{I}$  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 minutos e a seguir centrifugados durante 20 minutos (2800 rpm) 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 dos mesmos, foram avaliados diretamente. Com base nos valores obtidos nos tubos contendo insulina conhecida, elaborou-se a curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores desconhecidos das amostras.

Os resultados foram expressos em ng/mL de insulina secretada durante o experimento.

#### 5.2.5.5. Resistência à insulina

O índice de resistência à insulina adotado foi “*Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*” (HOMA-IR), modelo matemático simplificado de representação do sistema homeostático glicose-insulina, preditivo de resistência à insulina. Este índice, utilizando glicose e insulina de jejum, avaliou a possível ocorrência de resistência à insulina através da fórmula: <sup>112</sup>

$$\text{HOMA-IR} = (\text{insulina de jejum [ng/mL]} \cdot \text{glicose de jejum [mg/dL]}) / 22.5$$

#### 5.2.5.6. Leptina

A concentração sérica de leptina foi determinada por ensaio imunoenzimático usando o *kit* comercialmente disponível (CRYSTAL CHEM INC., Chicago, IL, USA). Poços de microplaca revestidos com anticorpo anti-leptina de rato foram inicialmente lavados por duas vezes com 300 µL de tampão de lavagem. Em cada poço foram pipetados 45 µL de solução diluente de amostra, 50 µL de leptina sérica de cobaias anti ratos e 5 µL de amostra ou curva padrão de leptina de rato (0, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 e 12800 pg/mL). Após incubação por 20 horas em temperatura de 4°C, a microplaca foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem. Foram adicionados 100 µL de um conjugado enzimático anti-IgG de cobaias e incubado por 3 horas a 4°C. O conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado 7 vezes com 300 µL de solução de lavagem, seguido da adição de 100 µL de solução de extrato enzimático que reagiu por 30 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. A reação enzimática foi bloqueada pela adição de 100 µL de uma solução “de finalização”. A leitura foi realizada em um leitor de

microplacas dentro de 30 minutos (medição do comprimento de onda a 450 nm, subtraindo o comprimento de onda: 630 nm). A concentração de leptina sérica foi calculada a partir de uma curva padrão e os resultados expressos em pg/mL.



## VI - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (Erro Padrão da Média) para o número de ratos (n) indicado. Inicialmente, foi aplicado o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Quando necessário, foi usado a transformação Box-Cox para corrigir a heterogeneidade das variâncias ou não-normalidade.<sup>113</sup> Todos os dados foram subseqüentemente analisados por análise de variância (ANOVA) a dois fatores (estado nutricional e estado fisiológico), seguido pelo teste de Tukey-HSD, para diferenças individuais entre os grupos, quando necessário.

Análises de correlação foram usadas para examinar a relação entre as concentrações séricas de insulina e leptina e diversas variáveis preditoras de obesidade. Em todas as comparações, foi aceito como significância estatística o valor de  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas foram feitas usando o programa de computador “Statistic for Windows”, versão 4.3, 1993 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

**RESULTADOS**

---

## VII – RESULTADOS

O consumo alimentar absoluto e relativo ao peso corporal, a variação de peso e o peso corporal final foram modificados em função do estado fisiológico ( $F_{1,19}=22,28$ ;  $p<0,001$ ;  $F_{1,19}=5,57$ ;  $p<0,03$ ;  $F_{1,19}=49,79$ ;  $p<0,000$ ;  $F_{1,19}=19,52$ ;  $p<0,001$ , respectivamente). Todas as ratas prenhes exibiram aumento significativo dessas variáveis, independente do estado nutricional (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal inicial e final (g), variação de peso (g), consumo alimentar absoluto (g) e relativo (g/100g), de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP)

	Grupos			
	CNP (5)	CP (7)	HNP (5)	HP (6)
Peso corporal inicial	245±3	258±10	259±6	250±5
Variação de peso	19±8	51±2*	17±8	52±3*
Peso corporal final	264±9	309±10*	276±11	302±4*
Consumo alimentar absoluto	207±14	255±11*	204±15	263±9*
Consumo alimentar relativo	78±4	83±4*	74±5	87±3*

Valores expressos em média ± EPM do número de ratas entre parênteses.

\*Diferenças em relação às ratas não prenhes (ANOVA a dois fatores).

As concentrações séricas de proteínas totais, albumina, insulina, leptina, bem como do índice HOMA, não foram significativamente diferentes entre os grupos avaliados. A glicemia sofreu influência apenas do estado fisiológico ( $F_{1,19}=9,02$ ;  $p<0,01$ ), ou seja, ratas CP e HP apresentaram redução da glicose sérica (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações séricas de albumina (g/dL), proteínas totais (g/dL), glicose (mg/dL), insulina (ng/mL), leptina (pg/mL) e índice de resistência à insulina (HOMA-IR) de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP)

	Grupos			
	CNP (5)	CP (7)	HNP (5)	HP (6)
Albumina	3,45±0,16	3,40±0,19	3,25±0,24	3,86±0,26
Proteínas totais	6,58±0,73	6,53±0,25	6,33±0,68	6,92±0,37
Glicose	77±4	54±6*	76±5	69±5*
Insulina	0,51±0,15	0,77±0,09	0,67±0,22	0,89±0,13
Leptina	2906±826	4436±986	3186±982	4960±766
HOMA-IR	1,79±0,58	1,89±0,33	2,20±0,65	2,70±0,39

Valores expressos em média ± EPM do número de ratas entre parênteses.

\*Diferenças em relação às ratas não prenhes (ANOVA a dois fatores).

A leptinemia e a insulinemia não se correlacionaram significativamente com a ingestão alimentar, quando os dados dos grupos foram combinados ou separados de acordo com o estado fisiológico ou nutricional.

O peso absoluto do TAM foi significativamente modificado pelos estados fisiológico ( $F_{1,19}=18,13$ ;  $p<0,001$ ) e nutricional ( $F_{1,19}=20,35$ ;  $p<0,001$ ), ou seja, em ratas HNP, HP e CP houve aumento do peso do TAM (Tabela 3). Quando essa variável foi expressa em proporção ao peso corporal (g/100g), verificou-se o efeito apenas do estado nutricional ( $F_{1,19}=15,20$ ;  $p<0,001$ ). Ratas HNP e HP, independente do estado fisiológico, mostraram peso relativo do TAM maior comparadas às ratas CNP e CP (Tabela 3).

O peso absoluto do tecido adiposo branco gonadal não se modificou em função da prenhez, da restrição protéica ou da interação entre ambos, mas quando expresso em proporção ao peso corporal (g/100g), o GON foi afetado somente pelo estado fisiológico ( $F_{1,19}=17,11$ ;  $p<0,001$ ). Assim, ratas dos grupos CP e HP exibiram valores menores em comparação às dos grupos CNP e HNP (Tabela 3).

O peso do RET, tanto em valor absoluto como em valor relativo, não se modificou em função dos efeitos avaliados (Tabela 3). Porém, houve correlação positiva entre a concentração sérica de leptina e os pesos absolutos e relativos (g/100g) dos tecidos adiposos RET ( $r=0,36$ ,  $p<0,002$ ;  $r=0,22$ ,  $p<0,02$ , respectivamente) e TAM ( $r=0,37$ ,  $p<0,02$ ;  $r=0,18$ ,  $p<0,04$ , respectivamente) quando todos os grupos foram incluídos na análise (Figuras 1A a 1D). Quando se considerou apenas o estado fisiológico, verificou-se correlação positiva entre leptinemia e pesos do RET ( $r=0,41$ ,  $p<0,01$ ) e GON ( $r=0,39$ ,  $p<0,02$ ) em ratas CP e HP, com o peso do TAM ( $r=0,49$ ,  $p<0,02$ ) em ratas CNP e HNP. A avaliação pelo estado nutricional mostrou correlação positiva entre leptina e peso do RET e TAM, tanto em ratas HNP e HP ( $r=0,40$ ,  $p<0,03$ ;  $r=0,52$ ,  $p<0,01$ , respectivamente), como em ratas CNP e CP ( $r=0,42$ ,  $p<0,02$ ;  $r=0,47$ ,  $p<0,01$ , respectivamente).

Tabela 3. Peso fresco em valores absolutos e relativos dos tecidos adiposos branco retroperitoneal (RET) e gonadal (GON) e do tecido adiposo marrom (TAM), de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP)

	Grupos			
	CNP (5)	CP (7)	HNP (5)	HP (6)
	g			
RET	4,9±0,7	5,2±0,7	4,3±0,4	4,8±0,4
GON	11,1±0,7	9,9±0,7	11,8±1,2	10,5±0,5
TAM	0,26±0,02	0,29±0,01*	0,30±0,02 <sup>§</sup>	0,38±0,01* <sup>§</sup>
	g/100g			
RET	1,86±0,28	1,66±0,18	1,53±0,11	1,60±0,15
GON	4,22±0,29	3,21±0,20*	4,26±0,26	3,50±0,20*
TAM	0,098±0,007	0,095±0,004	0,108±0,008 <sup>§</sup>	0,125±0,004 <sup>§</sup>

Valores expressos em média ± EPM do número de ratas entre parênteses.

\*Diferenças em relação às ratas não prenhes (ANOVA a dois fatores).

§ Diferenças em relação às ratas alimentadas com dieta controle (ANOVA a dois fatores).

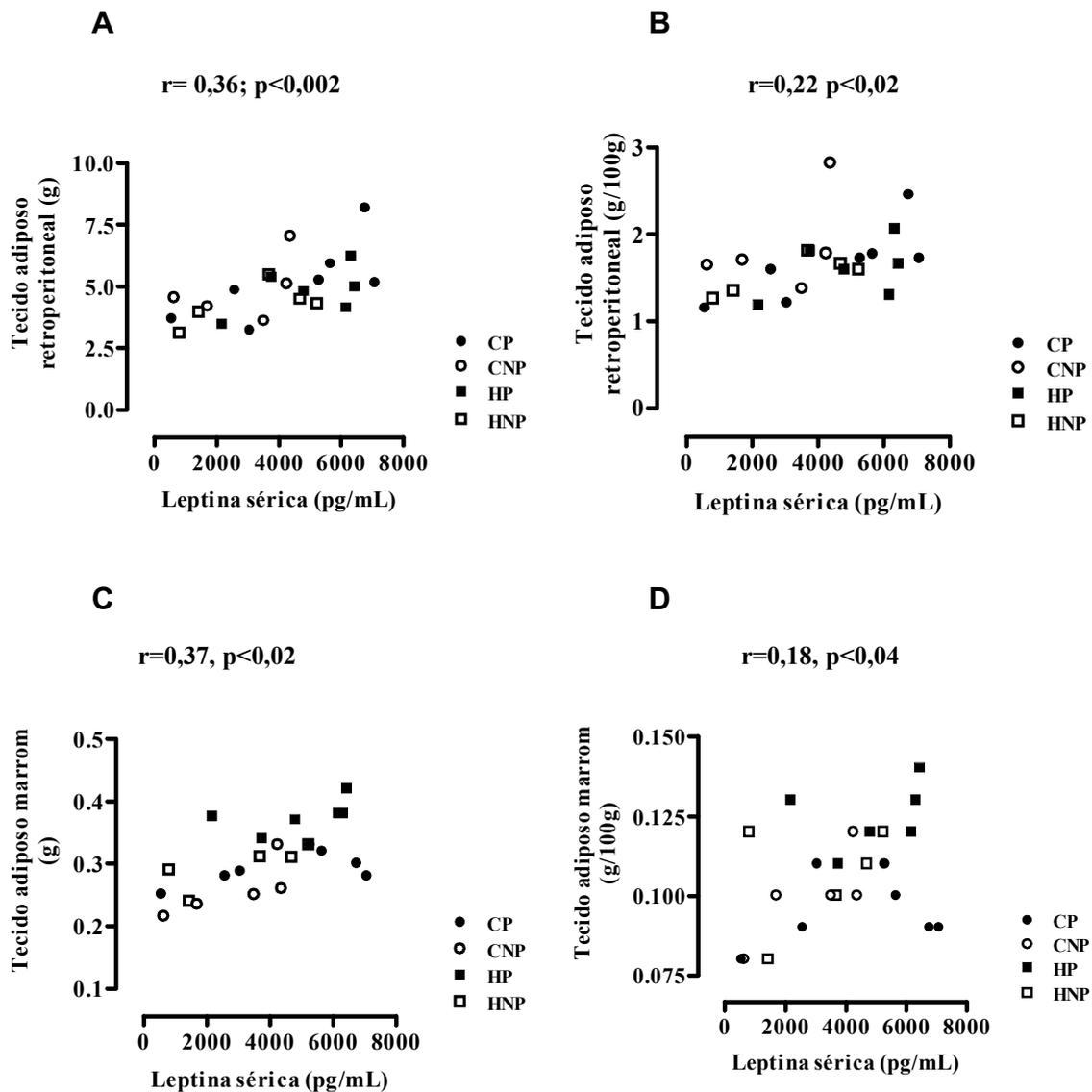


Figura 1 – Correlação entre leptina sérica (pg/mL) e pesos absoluto (A) e relativo (B) do tecido adiposo branco retroperitoneal, e pesos absoluto (C) e relativo (D) do tecido adiposo marrom de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP)

Não foi verificado nenhum efeito significativo da prenhez, da restrição protéica ou da interação entre esses fatores sobre o peso fresco da carcaça e seus componentes (lipídios, água, proteína e cinzas) em valores absolutos e relativos, exceto por um efeito significativo do estado nutricional sobre o conteúdo relativo de lipídio da carcaça, que

foi menor nos grupos HNP e HP ( $F_{1,19}=4,34$ ;  $p=0,05$ ) comparado aos grupos CP e CNP (Tabela 4).

Foi observada, apenas em ratas HNP e HP, independente do estado fisiológico, uma correlação positiva entre o conteúdo absoluto de lipídio da carcaça e a concentração sérica de insulina ( $r=0,37$ ;  $p<0,05$ ), de leptina ( $r=0,37$ ;  $p<0,05$ ) e o índice HOMA-IR ( $r=0,44$ ;  $p<0,03$ ).

Tabela 4. Composição da carcaça (g, g/100g de peso da carcaça) de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP)

	Grupos			
	CNP (5)	CP (7)	HNP (5)	HP (6)
	g			
Carcaça fresca	201±7	216±7	205±7	210±3
Proteína	47±2	53±2	51±1	50±2
Lipídio	34±3	37±5	28±3	31±1
Água	115±4	122±5	121±5	125±3
Cinza	4,5±0,4	3,5±0,4	4,6±1,1	4±0,4
	g/100g de peso da carcaça			
Proteína	23,5±0,4	24,7±0,9	25,0±0,5	24±1,0
Lipídio	17,0±1,1	16,8±2,0	13,7±1,0 <sup>§</sup>	14,6±0,6 <sup>§</sup>
Água	57,2±0,9	56,9±1,9	59,1±0,8	59,5±0,9
Cinza	2,2±0,2	1,6±0,2	2,2±0,5	1,9±0,2

Valores expressos em média ± EPM do número de ratas entre parênteses.

<sup>§</sup>Diferenças em relação às ratas alimentadas com dieta controle (ANOVA a dois fatores).

A energia da carcaça, os ganhos de energia como lipídio, como proteína e o ganho de energia total não foram influenciados por nenhum dos fatores e nem pela interação entre estes, não havendo diferença entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5. Energia da carcaça, linha de base, ganhos de energia como lipídio, como proteína e ganho de energia total (kJ), de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP)

	Grupos			
	CNP (5)	CP (7)	HNP (5)	HP (6)
	kJ			
Energia da carcaça	2086±121	2270±207	1916±116	1998±50
Cálculo da linha de base	1715±18	1802±71	1846±58	1748±36
Ganho de energia total	372±115	468±171	150±91	250±48
Ganho como lipídio	369±101	410±176	122±94	214±52
Ganho como proteína	3±28	58±36	28±13	36±29

Valores expressos em média ± EPM do número de ratas entre parênteses.

As concentrações séricas de insulina e leptina não se correlacionaram com nenhuma das variáveis citadas acima, quando os grupos foram analisados juntos ou separados.



## VIII – DISCUSSÃO

A restrição protéica e a gravidez são condições comumente associadas a mudanças no padrão alimentar.<sup>8,18</sup> Os estudos associando essas duas condições têm mostrado resultados contraditórios. Em desacordo com os resultados obtidos por Snoeck e cols.<sup>114</sup> que verificaram um pequeno aumento e por Wunderlich e cols.<sup>115</sup>, que relataram redução do consumo de dieta em ratas prenhes desnutridas, no presente estudo a restrição de proteína durante a prenhez não produziu mudanças no comportamento alimentar. Independente da dieta recebida, as ratas prenhes exibiram ingestão alimentar maior, o que resultou em ganho de peso corporal significativo e, conseqüentemente, peso final maior em relação às não prenhes.

A esperada redução das concentrações séricas de albumina e proteínas totais em resposta à restrição de proteína e gravidez não foi observada no presente estudo, possivelmente devido ao curto período de exposição à privação nutricional e pelo estágio da prenhez. O típico aumento da retenção de nitrogênio visto na primeira metade de uma gravidez normal<sup>90,116</sup>, também esperado, não foi observado nas ratas prenhes, independente da dieta recebida, uma vez que o conteúdo de proteína da carcaça foi similar nesses grupos.

Durante a primeira fase da prenhez ocorre acumulação progressiva de depósitos de gordura materna devido ao aumento da lipogênese do tecido adiposo e da gliceroneogênese.<sup>117</sup> A restrição de proteína também está associada a aumento da gordura corporal.<sup>15,18,87</sup> Porém, no presente estudo, a prenhez reduziu a proporção do depósito de tecido adiposo GON, enquanto que a restrição protéica diminuiu a proporção de gordura da carcaça. Em ambas as situações os pesos absoluto e relativo do TAM foram aumentados. A hipertrofia do TAM poderia ser uma indicação do aumento

da atividade metabólica deste tecido e da termogênese induzida pela dieta, situação que explicaria a depleção de lipídios corporais na restrição protéica<sup>17</sup>, mas não na gestação.<sup>10</sup> Embora comumente verificada da metade para o final da gestação, essa hipertrofia pode estar relacionada ao acúmulo de lipídios<sup>10,12,118</sup> ou de água<sup>9</sup> neste tecido e não ao aumento da termogênese. Essa hipótese é reforçada por Fontera e cols. que verificaram aumento da razão entre os receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  e  $\beta_3$  e diminuição do conteúdo mitocondrial do TAM em ratas prenhes, indicando inibição da via de sinalização do sistema nervoso simpático e, conseqüentemente, menor atividade termogênica nesse tecido.<sup>9</sup>

Uma outra explicação para a redução do GON na prenhez é o aumento da resistência periférica à insulina, uma situação que prejudica a ação lipogênica e antilipolítica desse hormônio. A hiperinsulinemia é um achado comum e ocorre mesmo antes que a resistência à insulina se instale na gravidez.<sup>13,119</sup> Existe uma relação entre sensibilidade à insulina e acúmulo de lipídios nos tecidos maternos, já que mulheres com sensibilidade à insulina diminuída na fase pré-gravídica têm dificuldade de ganhar massa gordurosa no início da gestação.<sup>93</sup> Contudo, esta hipótese pode estar prejudicada se considerarmos que a fase gestacional em que as ratas foram avaliadas, final da fase anabólica, pode corresponder a um ponto de transição entre a sensibilidade aumentada, vista no início, e a resistência à insulina, verificada na fase tardia da prenhez.<sup>12,13</sup> Além disso a insulinemia e o índice HOMA-IR não foram afetados em ratas prenhes. Considerando que estas variáveis não se alteraram com a restrição protéica, a redução de gordura da carcaça também não pode ser creditada à resistência à insulina. É possível que a redução das reservas de gordura abdominal verificadas nas ratas prenhes esteja refletindo a ativação do sistema nervoso autônomo em resposta a hipoglicemia<sup>12</sup>, situação verificada neste estudo apenas nas ratas prenhes.

A insulina, hormônio regulador da ingestão alimentar e do gasto energético, se correlacionou significativamente apenas com o peso de gordura da carcaça em ratas submetidas à restrição protéica. A perda da correlação entre insulinemia e ingestão alimentar pode ter ocorrido porque essas análises foram feitas considerando a insulina de jejum.

Em mamíferos a concentração de leptina é comumente elevada a partir da metade da prenhez<sup>120,121,122</sup> e na restrição protéica.<sup>15</sup> Neste estudo não foram observadas mudanças nas concentrações séricas de leptina em resposta à prenhez ou à restrição de proteínas e esse hormônio não se correlacionou com a ingestão alimentar. Entretanto, a concentração sérica de leptina similar entre os grupos, associada ao aumento do consumo alimentar visto em ratas prenhes, sugere um estado de resistência à leptina, situação comumente encontrada na metade da gravidez.<sup>25</sup>

Existem evidências de que o aumento da concentração plasmática de leptina na gestação nem sempre se correlaciona com a adiposidade<sup>123,124</sup>, incluindo os depósitos do TAM<sup>9</sup>, enquanto na restrição protéica a leptina se correlaciona diretamente com o conteúdo de gordura na carcaça.<sup>15</sup> Neste estudo houve uma correlação positiva entre a concentração sérica de leptina e a massa absoluta e relativa dos depósitos de gordura RET e TAM, quando todos os grupos foram considerados na análise. Entretanto, em ratas prenhes este hormônio se correlacionou com os depósitos de gordura abdominal RET e GON, enquanto nas não prenhes houve correlação apenas com a massa do TAM. Entre as ratas submetidas à restrição protéica, verificou-se correlação positiva entre leptina e gordura da carcaça, e os depósitos de gordura RET e TAM. Assim, a concentração sérica de leptina na prenhez parece refletir o conteúdo de gordura abdominal, enquanto na restrição protéica, reflete o conteúdo de gordura corporal total.

O conjunto de resultados obtidos neste estudo nos permite concluir que a restrição protéica durante a prenhez não alterou os perfis séricos de insulina e leptina, os quais também não se correlacionaram com a ingestão alimentar. As correlações desses hormônios com a adiposidade resultaram, predominantemente, do efeito do estado fisiológico em relação ao estado nutricional, possivelmente devido ao tempo de exposição à restrição protéica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization, 1997.
2. Popkin BM, Doak CM. The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. *Nutr Rev* 1998;56:106–14.
3. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição. Condições nutricionais da população brasileira: adultos e idosos (Nutritional conditions of adult and elderly Brazilian population). Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição, Brasília: INAN/Ministério da Saúde 1991.
4. Coitinho DC. A influência da história reprodutiva no índice de massa corporal de mulheres brasileiras (The influence of childbearing on the body mass index in Brazilian women) PhD Thesis, Universidade de São Paulo 1998.
5. Florêncio TT. Obesity in adult population residing in a “sem teto”- homeless encampment in the northeast of Brazil. *Intern J Obes* 1998, 22: 245S.
6. Monteiro CA, Mondini L. The changing nature of nutrition disorders in the developing countries: the case of Brazil. Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Congress of Nutrition, Montreal: Canadian Federation of Biological Science 1998.

7. Popkin BM, Bisgrove ES. Urbanization and nutrition in low-income countries. *Food Nutr Bull* 1988, 10: 3-23.
8. Herrera E, Lasunción MA, Palacín M, Zorzano A, Bonet B. Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes* 1991; 40 Suppl 2:83-7.
9. Frontera M, Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Català-Niell A, Roca P, Garcia-Palmer FJ, et al. Rat brown adipose tissue thermogenic features are altered during mid-pregnancy. *Cell Physiol Biochem* 2005; 15:203-210.
10. Abelenda M, Puerta ML: Inhibition of diet-induced thermogenesis during pregnancy in the rat. *Pflugers Arch* 1987; 409:314-7.
11. López-Luna P, Maier I, and Herrera E. Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. *Biol Neonate* 1991; 60: 29–38.
12. Ramos MP, Crespo-Solans MD, del Campo S, Cacho J, Herrera E. Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 2003; 285: E318-E328.
13. Muñoz C, López-Luna P, Herrera E. Glucose and insulin tolerance tests in the rat on different days of gestation. *Biol Neonate* 1995; 68: 282–291.

14. Sorenson RL, Brelje TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy:  $\beta$ -cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 1997; 29: 301–307.
15. Du F, Higginbotham DA, White BD. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr* 200; 130: 514-521.
16. Even PC, Bertin E, Gangnerau M-N, Roseau S, Tomé D, Portha B. Energy restriction with protein restriction increases basal metabolism and meal-induced thermogenesis in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R751-R759.
17. Rothwell NJ, Stock MJ. Influence of carbohydrate and fat intake on diet-induced thermogenesis and brown fat activity in rats fed low protein diets. *J Nutr* 1987; 117: 1721-1726.
18. White BD, Dean RG, Martin RJ. An association between low levels of dietary protein, elevated NPY gene expression in the basomedial hypothalamus and increased food intake. *Nutr Sci* 1998; 1:173-182.
19. Noblet, J, Henry, Y, Dubois S. Effect of protein and lysine levels in the diet on body gain composition and energy utilization in growing pigs. *J Animal Sci* 1987; 65: 717-726.

20. Leon-Quinto Adnot, Portha B. Alteration of the counterregulatory hormones in the conscious rat after protein-energy restriction. *Diabetologia* 1997; 40: 1028-1034.
21. Okitolonda W, Brichard SM, Henquin JC. Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis on the rat. *Diabetologia* 1987; 30:946-951.
22. Escriva F, Kergoat M, Bailbé C, Pascual-Leone AM, Portha B. Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. *Diabetologia* 1991; 34:559-564.
23. Picarel-Blanchot F, Alvarez C, Bailbe D, Pascual-Leone AM, Portha B. Changes in insulin action and insulin secretion in the rat after dietary restriction early in life: influence of food restriction versus low-protein food restriction. *Metabolism* 1995; 44: 1519-1526.
24. Havel P. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med* 2001; 226(11): 963-977.
25. Seeber RM, Smith JT, Waddell BJ. Plasma leptin binding activity and hipotalamic leptin receptor *Biol Reprod* 2002; 66: 1762-1767

26. Kopelman, PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404: 635-643.
27. York, DA. Lessons from animal models of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996; 25: 781-800.
28. Woods SC, Seeley RJ. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* 2000; 16:894-902.
29. Strader AD, Woods SC. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 2005; 128:175-191.
30. Lundgren O. Interface between the intestinal environment and the nervous system. *Gut* 2004; 53(Suppl 2):16–18.
31. Mei N. Intestinal chemosensitivity. *Physiol Rev* 1985; 65:211– 237.
32. Read N, French S, Cunningham K. The role of the gut in regulating food intake in man. *Nutr Rev* 1994; 52:1–10.27.
33. Raybould HE. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. I. Sensing of lipid by the intestinal mucosa. *Am J Physiol* 1999; 277:G751–G755.
34. Holzer P, Michl T, Danzer M, Jovic M, Schicho R, Lippe IT. Surveillance of the gastrointestinal mucosa by sensory neurons. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52:505–521.

35. Reidelberger RD. Cholecystokinin and control of food intake. *J Nutr* 1994; 124:S1327–S1333.
36. Beck B. Gastric inhibitory polypeptide: a gut hormone with anabolic functions. *J Mol Endocrinol* 1989; 2:169–174.
37. Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest* 1985; 75:1144–1152.
38. Chey WY, Chang T. Neural hormonal regulation of exocrine pancreatic secretion. *Pancreatology* 2001; 1:320–335.
39. Holle GE, Dietl J, Demir I. Influence of the intramural innervation on the morphogenesis of the enteroendocrine cells and the genetic construct involved (review). *Int J Mol Med* 2003; 11: 275–285.
40. Cummings DE, Shannon MH. Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight. *Arch Surg* 2003; 138:389–396.
41. Tchöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407:908–913.
42. Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 2002; 26:393–428.

43. Powley TL, Phillips RJ. Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes? I. Morphology and topography of vagal afferents innervating the GI tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283:G1217–G1225.
44. Deutsch JA. The role of the stomach in eating. *Am J Clin Nutr* 1985; 42:1040–1043.
45. Phillips RJ, Powley TL. Gastric volume rather than nutrient content inhibits food intake. *Am J Physiol* 1996; 271:R766–R769.
46. Woods SC, Seeley RJ, Porte D Jr, Schwartz M. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 1998; 280(5368):1378-83.
47. Belfrage P, Fredrikson G, Nilsson NO, Stralfors P. Regulation of adipose-tissue lipolysis by phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *Int J Obes* 1981; 5(6):635-41.
48. Smith CJ, Manganiello VC. Role of hormone-sensitive low Km cAMP phosphodiesterase in regulation of cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. *Mol Pharmacol* 1989; 35(3):381-6.
49. Romsos DR, Leveille GA. Effect of diet on activity of enzymes involved in fatty acid and cholesterol synthesis. *Adv Lipid Res* 1974; 12(0):97-146.

50. Havel PJ, Townsend R, Chaump L, Teff K. High-fat meals reduce 24-h circulating leptin concentrations in women. *Diabetes* 1999; 48:334-341.
51. Woods SC, Decke E, Vasselli JR. Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychology* 1974; 81: 26-43.
52. Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin KG, Woods SC, Porte DJ. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocrinol Rev* 1992; 13:387-414.
53. Corp ES, Woods SC, Porte D Jr, Dorsa DM, Figlewicz DP, Baskin DG. Localization of <sup>125</sup>I-Insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neurosci Lett* 1986; 70:17.
54. Figlewicz DP, Dorsa DM, Stein LJ, Baskin DG, Paquette T, Greenwood MR, et al. Brain and liver insulin binding is decreased in Zucker rats carrying the "fa" gene. *Endocrinology* 1985; 117:1537.
55. Baskin DG, Marks JL, Schwartz MW, et al. Insulin and insulin receptors in the brain in relation to food intake and body weight. In *Endocrine and Nutritional Control of Basic Biological Functions*, ed. H Lehnert, R Murison, H Weiner, D Hellhammer, J Beyer, pp. 202–22. Stuttgart, Ger.: Hogrefe & Huber, 1990:220.
56. Le Roith D, Rojeski M, Roth J. Insulin receptors in brain and other tissues: similarities and differences. *Neurochem Int* 1988; 12:419.

57. Woods SC, Stein LJ, McKay LD, Porte D Jr. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 1979; 282:503.
58. Woods SC, Figlewicz DP, Schwartz MW, Porte D Jr. A re-assessment of the regulation of adiposity and appetite by the brain insulin system. *Int J Obes* 1990; 14(Suppl 3):69.
59. Woods SC, Chavez M, Park CR, Riedy C, Kaiyala K, Richardson RD, et al. The evaluation of insulin as a metabolic signal controlling behavior via the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1996; 20:139–44.
60. Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D Jr. Insulin and the central regulation of energy balance: update 1994. *Endocr Monogr Rev* 1994; 2:109.
61. Kapeller R, Moriarty A, Strauss A, Stubdal H, Theriault K, Siebert E, et al. Tyrosine phosphorylation of tub and its association with Src homology2 domain-containing proteins implicate tub in intracellular signaling by insulin. *J Biol Chem* 1999; 274:24980.
62. Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 1995; 44: 147-151.

63. Zhang Y, Proença R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432.
64. Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 1973; 9:294–298.
65. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens RW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334: 292-295.
66. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269(5223):546-9.
67. Seeley RJ, van Dijk G, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Nelligan JA, et al. Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Horm Metab Res* 1996; 28(12):664-8.
68. Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, DeSauvage F. Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1726-1730.

69. Scarpace PJ, Matheny M, Pollock BH, Turner N. Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J Physiol* 1997, 273: E226-E220.
70. Collins S, Kuhn CM, Petro AE, Swick AG, Chrnyk BA, Surwit RS. Role of leptin in fat regulation. *Nature* 1996; 380: 677.
71. Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 1997; 100: 270-278.
72. Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MGJ, Schwartz MW. Intracellular signaling: key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 2001; 413: 794-795.
73. Niswender KD, Schwartz MW. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol* 2003; 24:1-10.
74. Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Intern J Obes Rel Metabol Dis* 2001; 25 Suppl 5 S63–S67.
75. Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, et al. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 1998; 21:1375-1385.

76. Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998; 393 72–76.
77. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *PNAS* 1998; 95:15043-15048.
78. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of *Agrp* and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neurosc* 1998; 1:271–272.
79. Ferreira F, Barbosa HCL, Stoppiglia LF, Delghingaro-Augusto V, Pereira EA, Boschero AC, et al. Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA- $\alpha$  expression. *J Nutr* 2004; 134: 63-67.
80. Swick RW, Gribskov CL. The effect of dietary protein levels on diet-induced thermogenesis in the rat. *J Nutr* 1983; 113: 2289-2294.
81. Deschepper K, DeGroot G. Effects of dietary protein, essential and non-essential amino acids on the performance and carcass composition of male broiler chickens. *Br Poult Sci* 1995; 36: 229-245.

82. Zhao XQ, Jorgensen H, Gabert VM, Eggum BO. Energy metabolism and protein balance in growing rats housed in 18°C or 28°C environments and fed different levels of dietary protein. *J Nutr* 1996; 126: 2036-2043.
83. Beck B, Dollet JM, Max JP. Refeeding after various times of ingestion of a low protein diet: effects on food intake and body weight in rats. *Physiol Behav* 1989; 45: 761-765.
84. Mercer LP, Kelley DS, Humphries LL, Dunn JD. Manipulation of central nervous system histamine or histaminergic receptors (H1) affects food intake in rats. *J Nutr* 1994; 124: 1029-1036.
85. White BD, Porter MH, Martin RJ. Protein selection, food intake, and body composition in response to the amount of dietary protein. *Physiol Behav* 2000; 68(5): 673-681.
86. Webster AJF. Energy partitioning, tissue growth and appetite control. *Proc Nutr Soc* 1993; 52:69-76.
87. White BD, He B, Dean RG, Martin RJ. Low protein diets increase neuropeptide y gene expression in the basomedial hypothalamus of rats. *J Nutr* 1994; 124: 1152-1160.
88. Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN. Programming of intermediary metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185: 81-91.

89. Mistry AM, Romsos DR. Intracerebroventricular leptin administration reduces food intake in pregnant and lactating mice. *Exp Biol Med* 2002; 227(8): 616-619.
90. Beaton GH, Beare J, Ryu MH, McHenry EW. Protein metabolism in the pregnant rat. *J Nutr* 1954; 54: 291-304.
91. Jovanovic L, Knopp R H, Brown Z, Conley MR, Park E, Mills JL, et al. Declining insulin requirement in the late first trimester of diabetic pregnancy. *Diabetes Care* 2001; 24: 1130–1136.
92. Mills JL, Jovanovic L, Knopp R, Aarons J, Conley M, Park E, et al. Physiological reduction in fasting plasma glucose concentration in the first trimester of normal pregnancy: the Diabetes in Early Pregnancy Study. *Metabolism* 1998; 47: 1140–1144.
93. Catalano PM, Roman-Drago NM, Amini SB, Sims EAH. Longitudinal changes in body composition and energy balance in lean women with normal and abnormal glucose tolerance during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 156–165.
94. Ryan EA, O’Sullivan MJ, Skyler JS. Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes* 1985; 34: 380–389.

95. Kawai M, Yamaguchi M, Murakami T, Shima K, Murata Y, Kishi K. The placenta is not the main source of leptin production in pregnant rat: gestational profile of leptin in plasma and adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240:798–802.
96. Shirley B. The food intake of rats during pregnancy and lactation. *Lab Anim Sci* 1984; 34:169-172
97. Rosso P. Regulation of food intake during pregnancy and lactation. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 499:191-196.
98. Henson MC, Castracane VD. Leptin in pregnancy. *Biol Reprod* 2000; 63:1219–1228.
99. Hoffman DJ, Sawaya AL, Coward WA, Wright A, Martins PA, de Nascimento C, Tucker KL, Roberts SB. Energy expenditure of stunted and nonstunted boys and girls living in the shantytowns of São Paulo, Brazil. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(4):1025-31.
100. Popkin BM. The nutrition transition in low income countries: an emerging crisis. *Nutr Rev* 1994; 52: 285-298.
101. Sichieri R, Coitinho D, Leao M, Recine E, Everthard JE. High temporal, geographic, and income variation in body mass index among adults in Brazil. *Am J Public Health* 1994; 84: 793-806.

102. Monteiro CA. Da desnutrição para obesidade: a transição nutricional no Brasil (From undernutrition to obesity: nutrition transition in Brazil) In: Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e suas doenças. São Paulo: Hucitec 1995, 247-255.
103. Popkin BM, Richard MK, Monteiro CA. Stunting is associated with overweight in children of four nations that are undergoing the nutrition transition. J Nutr 1996a; 126: 3009-3016.
104. Popkin BM, Zohoori N, Baturin A. Elderly nutritions, in Russian: is there a public health problem? Am J Public Health 1996b; 86: 355-360.
105. Manual para Técnicos em Laboratórios. Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), 2<sup>a</sup> ed. 1996.
106. Reeves, PG, Nielsen, FH & Fahey Jr, CG. 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.
107. Gonçalves EL, Waitzberg DL, Bevilacqua RG, Bevilacqua LR. Composição corpórea em diferentes condições nutricionais - estudo experimental. Rev Paul Med 1982; 108: 125-133.

108. 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.
109. Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and measurements of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971; 31: 87-96.
110. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Path* 1969; 22: 158-61.
111. 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.
112. Pacini G, Mari A. Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and b-cell function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17:305-322.
113. 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, New York 1995; 392-450
114. Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoett JJ. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* 1990; 57:107-118.

115. Wunderlich SM, Baliga BS, Munro HN. Rat placental protein synthesis and peptide hormone secretion in relation to malnutrition from protein deficiency or alcohol administration. *J Nutr* 1979; 109(9):1534-41.
116. Zuspan F, Goodrich S. Metabolic studies in normal pregnancy. I. Nitrogen metabolism. *Am J Obstet Gynecol* 1968; 100(1):7-14.
117. Palacin M, Lasuncion MA, Asuncion M, Herrera E. Circulating metabolite utilization by peri-uterine adipose tissue in situ in the pregnant rat. *Metabolism* 1991; 40(5):534-9.
118. Villarroya F, Felipe A, Mampel T. Sequential changes in brown adipose tissue composition, cytochrome oxidase activity and GDP binding throughout pregnancy and lactation in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1986; 882(2):187-91.
119. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414(6865):799-806.
120. Ehrhardt RA, Slepatis RM, Bell AW, Boisclair YR. Maternal leptin is elevated during pregnancy in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 21(2):85-96.
121. Kronfeld-Schor N, Zhao J, Silvia BA, Bicer E, Mathews PT, Urban R, Zimmerman S, Kunz TH, Widmaier EP. Steroid-dependent up-regulation of adipose leptin secretion in vitro during pregnancy in mice. *Biol Reprod* 2000; 63(1):274-80.

122. Kronfeld-Schor N, Zhao J, Silvia BA, Mathews PT, Zimmerman S, Widmaier EP, Kunz TH. Hyperleptinemia in pregnant bats is characterized by increased placental leptin secretion in vitro. *Endocrine* 2001; 14(2):225-33.
123. Ehrhardt RA, Bell AW, Boisclair YR. Spatial and developmental regulation of leptin in fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282(6):R1628-35.
124. Gavrilova O, Barr V, Marcus-Samuels B, Reitman M. Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272(48):30546-51.
125. Widmaier EP, Long J, Cadigan B, Gurgel S, Kunz TH. Leptin, corticotropin-releasing hormone (CRH), and neuropeptide Y (NPY) in free-ranging pregnant bats. *Endocrine* 1997; 7(2):145-50.

# 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](#)