

CRISTIANE LOPES PINTO FERREIRA

**CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LEPTINA E INSULINA EM RATAS
LACTANTES SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO PROTÉICA:
IMPLICAÇÕES PARA O BALANÇO ENERGÉTICO**

CUIABÁ – MT

2005

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LEPTINA E INSULINA EM RATAS
LACTANTES SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO PROTÉICA:
IMPLICAÇÕES PARA O BALANÇO ENERGÉTICO

Orientanda: Cristiane Lopes Pinto Ferreira

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Helena Gaíva Gomes da Silva

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Queiroz Latorraca

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

CUIABÁ - MT

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

F383c Ferreira, Cristiane Lopes Pinto.

Concentrações séricas de leptina e insulina em ratas lactantes submetidas à restrição protéica: implicações para o balanço energético / Cristiane Lopes Pinto Ferreira. – Cuiabá: a Autora, 2005. 79 p.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Gaíva Gomes da Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso. Faculdade de Ciências Médicas. Campus Cuiabá.

1. Medicina. 2. Dieta hipoprotéica. 3. Leptina sérica. 4. Insulina sérica. 5. Balanço energético. 6. Lactação. 7. Rata. I. Título.

CDU 612.664:599.323.4

À Deus

Ao meu esposo

E à minha família

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. **Maria Helena Gaíva Gomes da Silva** pela oportunidade, orientação e incentivo durante a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. **Márcia Queiroz Latorraca** pela presteza, dedicação e valiosa contribuição de seus ensinamentos, não mediu esforços em momento algum para co-orientar-me em todas as etapas desta pesquisa. Serei eternamente grata!

À Prof^a. MSc. **Vanessa Cristina Arantes**, pela colaboração na realização das análises bioquímicas.

Ao grande amigo **Celso Roberto Afonso** pela paciência, carinho e colaboração, sempre me ajudando nos trabalhos.

Ao Dr. **Carlos Henrique Fregadolli** pelo auxílio nas análises estatísticas.

À **Gláucia, Marciane, Loanda, Elisângela, Marise, Salete e Roberto** pela amizade, companheirismo, carinho e pelas intermináveis risadas.

À **Letícia, Talita e Bárbara**, pelos agradáveis encontros diários e pela imensa alegria que vocês transmitem.

À **Universidade Federal de Mato Grosso e ao Laboratório de Avaliação Biológica dos Alimentos**, que gentilmente cederam suas instalações para a realização desta pesquisa.

Ao **Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** que oportunizou mais essa etapa da minha formação profissional.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso**, pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do meu trabalho.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me auxiliaram na conquista dessa etapa. Muito obrigada!

ÍNDICE

RESUMO	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo Geral	19
3.2. Objetivos Específicos	19
4. REFERÊNCIAS	20
5. TRADUÇÃO DO ARTIGO	37
INTRODUÇÃO	39
MATERIAIS E MÉTODOS	40
RESULTADOS	43
DISCUSSÃO	47
6. ARTIGO ORIGINAL	58
INTRODUCTION	60
MATERIALS AND METHODS	61
RESULTS	64
DISCUSSION	68
REFERENCES	79

RESUMO

OBJETIVO: Lactação e restrição protéica produzem alterações metabólicas e no consumo alimentar que poderiam contribuir para o aumento da adiposidade. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da restrição protéica nas concentrações de insulina e leptina séricas e suas correlações com o balanço energético na lactação.

MÉTODOS: Foram avaliados quatro grupos de ratas: controle não lactante (CNL), controle lactante (CL), hipoprotéico não lactante (HPNL), e hipoprotéico lactante (HPL). As ratas receberam dietas isocalóricas contendo 6% de proteína (dieta hipoprotéica) ou 17% de proteína (dieta controle) do primeiro dia de gestação ao 14º dia de lactação. Foram avaliados a ingestão energética, a composição corporal, o balanço energético, as concentrações séricas de insulina e leptina e a relação entre esses hormônios e diversos parâmetros relacionados à obesidade.

RESULTADOS: Ratas HPL exibiram hipoinsulinemia, hiperleptinemia, hipofagia e gasto energético diminuído em relação às ratas CL. A perda de proteína na carcaça foi similar e a depleção de reservas de energia como gordura foi menor no grupo HPL em relação ao grupo CL, resultando em maior teor de gordura na carcaça no primeiro em comparação ao último grupo. A gordura corporal correlacionou-se inversamente com insulina sérica e diretamente com leptina sérica. Houve correlação negativa significativa entre leptina sérica e ingestão energética, e uma relação positiva entre energia ingerida e insulina sérica em ratas lactantes e na combinação dos dados de ambos os grupos. O gasto energético foi diretamente correlacionado com insulina sérica e, negativamente correlacionado com leptina sérica em ratas lactantes e quando os dados de ratas lactantes e não lactantes foram agrupados.

CONCLUSÃO: Ratas submetidas à restrição protéica durante a prenhez e a lactação, quando comparadas às ratas controles lactantes, mostraram no pico da lactação reservas maternas preservadas, devido ao balanço energético menos negativo. Esta adaptação metabólica foi obtida, ao menos em parte, pela hipoinsulinemia, que resultou no aumento da sensibilidade à insulina favorecendo o aumento da deposição de gordura, hiperleptinemia e hipofagia.

PALAVRAS CHAVES: dieta hipoprotéica, leptina sérica, insulina sérica, balanço energético, lactação.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem a Celso Roberto Afonso pela valiosa assistência técnica e a Professora Odila Watzel pela correção do inglês. Este trabalho é parte de uma dissertação apresentada por C.L.P. Ferreira como parte dos requerimentos para o grau de Mestre do Mestrado em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Médicas, UFMT.

ABSTRACT

OBJECTIVE: Lactation and protein restriction produce metabolic and food intake alterations that could enhance adiposity. The objective this study was to analyze the effect of protein restriction on the serum insulin and leptin concentrations and their relationship with energy balance during lactation.

METHODS: Four groups of rats were used in this study: control non-lactating (CNL) and control lactating (CL) groups fed a control diet, and low protein non-lactating (LPNL) and low protein lactating (LPL) groups, fed a low protein diet. Rats received isocaloric diets containing 6% protein (low-protein diet) or 17% protein (control diet) from the first day of pregnancy until the 14th day of lactation. Energy intake, body composition, energy balance, serum insulin and leptin concentrations and the relationship between these hormones and the several parameters related to obesity were analyzed.

RESULTS: LPL rats exhibited hypoinsulinaemia, hyperleptinaemia, hypophagia, and decreased energy expenditure compared to CL rats. The lost of protein carcass was lower in the LPL group compared to CL group, resulting in the greater carcass fat content in the first group in relation to the latter group. Body fat correlated inversely with serum insulin and directly with serum leptin. There was a significant negative correlation between serum leptin and energy intake, and a positive relationship between energy intake and serum insulin lactating rats and in the combining data from both groups. Energy expenditure was directly correlated with serum insulin and negatively with serum leptin in lactating rats and when data from non-lactating and lactating rats were pooled.

CONCLUSION: Rats submitted to protein restriction during pregnancy and lactation when compared to lactating control rats showed at peak of lactation, maternal reserves preserved due to energy balance minus negative. This metabolic adaptation was obtained, at least in part, by the hypoinsulinaemia that resulted in increased insulin sensitivity favoring enhances fat deposition, hyperleptinaemia and hypophagia.

KEY WORDS: low protein diet, serum leptin, serum insulin, energy balance, lactation

ACKNOWLEDGMENTS: The authors thank Celso Roberto Afonso for valuable technical assistance and Odila Watzel for editing the English. This work is part of a dissertation presented by C.L.P. Ferreira as partial

fulfillment of the requirements for a Master's degree in Health Science at the Faculdade de Ciências Médicas, UFMT.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura no corpo, sendo uma consequência do desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético ou de erros no metabolismo e na utilização de substratos (1).

Numerosos sinais periféricos contribuem para a regulação do consumo alimentar e da homeostase energética. Um grupo de sinais, denominados “sinais de saciedade” ou “sinais de curto prazo” controla o tamanho das refeições, mas tem pouco impacto sobre os estoques de gordura corporal, pois sozinhos são incapazes de sustentar mudanças no balanço energético (2). São “sinais de saciedade” os nutrientes (glicose, aminoácidos, gorduras), metabólitos (lactato, piruvato e corpos cetônicos), hormônios gastrintestinais (colecistoquinina, peptídio liberador do glucagon ou GLP-1, polipeptídio regulador da gastrina ou GRP, grelina, glucagon, polipeptídio pancreático, enterostatina, somatostatina, polipeptídio inibitório gástrico ou GIP etc.) e outros reguladores endócrinos (citocinas, glicocorticóides, hormônios tireoideanos e hormônio do crescimento) (3,2).

O segundo grupo denominado “sinais de adiposidade” ou “sinais de longo prazo”, está presente na circulação em proporção à ingestão energética recente e à adiposidade corporal. Ao atingirem a barreira hematoencefálica e o hipotálamo, esses sinais interagem com os “sinais de saciedade”. A insulina e a leptina são os “sinais de adiposidade” mais conhecidos e a administração tanto do primeiro quanto do segundo hormônio causa uma redução dose-dependente do consumo alimentar e do peso corporal (3).

No cérebro, vias opostas, mas paralelas originadas no núcleo arqueado do hipotálamo promovem a integração dos “sinais de saciedade” com os “sinais de adiposidade”. Aquelas com efeito anabólico líquido aumentam o consumo alimentar e reduzem o gasto energético e têm como principal representante o neuropeptídio Y. Aquelas com um efeito catabólico

líquido diminuem o consumo alimentar e aumentam o gasto energético e são representadas pelas melanocortinas cerebrais (3).

O papel da insulina como regulador do consumo alimentar, do balanço energético e da adiposidade foi inicialmente proposto no início da década de 1970 por Woods e colaboradores (4) e desde então evidências adicionais têm confirmado essa hipótese (5).

A insulinemia de jejum e em resposta a ingestão de uma refeição correlacionam-se com a adiposidade corporal. Além disso, num período de 24 horas a secreção e a concentração total de insulina na circulação sistêmica são proporcionais ao conteúdo de gordura corporal e a ingestão recente de carboidratos e proteínas (6). A gordura dietética não estimula a secreção de insulina (6), embora a presença de alguns ácidos graxos parece ser necessária para uma resposta secretória completa de insulina à glicose (7).

Os receptores de insulina têm sido identificados em várias regiões do cérebro implicadas na regulação do comportamento alimentar, incluindo o núcleo arqueado do hipotálamo (8). Embora os neurônios do sistema nervoso central (SNC) não produzam insulina, este hormônio é transportado dentro do cérebro por um mecanismo mediado por receptor, saturável em altas concentrações de insulina (9). O transporte de insulina no SNC é lento e ocorre em um período de horas após o aumento da insulinemia, reforçando a função da insulina como “sinal de longo prazo” da adiposidade, mais que um “sinal de curto prazo” de saciedade (2).

Os efeitos inibitórios da insulina sobre o consumo alimentar foram mostrados em alguns modelos animais. Ratos diabéticos insulinopênicos, ao receberem infusão desse hormônio no ventrículo cerebral em dose suficiente para manter a insulinemia e glicemia normais reduziram em 50% o consumo alimentar, indicando que pelo menos nesse modelo, a deficiência da insulina não é a única responsável pela hiperfagia (10). Também foi mostrada em camundongos que não expressavam receptores de insulina em neurônios específicos,

aumento da ingestão alimentar e dos estoques de tecido adiposo (11). A insulina também aumenta a atividade do sistema nervoso simpático e o gasto energético (12,13), modulando assim o balanço energético pela inibição da ingestão alimentar e pelo aumento da termogênese.

A insulina, um “sinal de longo prazo”, interage com a colecistocinina, um “sinal de curto prazo”, na regulação do balanço energético (2). Em babuínos, a administração de insulina no SNC em dose que não reduz significativamente o consumo alimentar, seguida de dose sub-limiar de colecistocinina intravenosa ou intraventricular, diminuiu mais que 50% o consumo alimentar, sugerindo que a sensibilidade da colecistocinina em induzir a saciedade é aumentada pela ação da insulina no cérebro (14,15).

A leptina, assim como a insulina, é um importante regulador da ingestão alimentar e do gasto energético. A teoria de que o tecido adiposo estaria envolvido na regulação do peso corpóreo, através de um mecanismo de “feedback”, foi proposta há mais de quarenta anos por Kennedy (16). Duas décadas depois, Coleman (17) mostrou a existência de um fator hormonal que agiria como um sinalizador da saciedade. Em 1994, Zhang e colaboradores (18) identificaram e caracterizaram em camundongos obesos *ob/ob* o gene mutante (*ob*) responsável pela obesidade. Esse gene é expresso primariamente no tecido adiposo e a sua clonagem mostrou que ele codificava uma proteína de 16 kDa, que foi denominada proteína OB ou leptina, nome derivado da palavra grega *leptos* que significa magro (18). Em seguida, o gene do receptor de leptina (*db*) foi clonado, e mutações nesse gene foram identificadas em camundongos geneticamente obesos *db/db* e ratos *fa/fa* (19,20).

A administração aguda de leptina diminui o consumo alimentar e induz a perda de peso em roedores (21,22). A leptina também tem sido implicada na regulação do gasto energético, uma vez que a sua administração induz uma perda de peso maior do que poderia

ser esperado somente pela redução do consumo alimentar (23,24). Esse aumento do gasto energético é mediado pelo sistema nervoso simpático (25,26).

Estudos recentes indicam que os efeitos inibitórios da leptina sobre o consumo alimentar são mediados pela sinalização através da fosfatidilinositol 3-quinase (27), que também participa da via da transdução de sinal da insulina. Essa via medeia ações comuns da insulina e da leptina no SNC regulando o comportamento alimentar e a homeostase metabólica (2,28,29).

A leptina e a colecistocinina também agem em sinergismo regulando o balanço energético. Em ratos alimentados, a administração periférica de colecistocinina diminui o consumo alimentar em mais de 50%, mas quando as concentrações séricas de leptina estão reduzidas pelo jejum a colecistoquinina não consegue reduzir o tamanho da refeição. Quando ratos em jejum recebem uma dose baixa de leptina a fim de igualar as concentrações séricas observadas em animais alimentados *ad libitum*, a capacidade da colecistocinina em diminuir o consumo alimentar é restaurada (30).

Estudos têm mostrado que as concentrações de leptina circulantes são altamente correlacionadas com o conteúdo de gordura corporal tanto em humanos (31,32,33) quanto em roedores (31,34,35). Observam-se diferenças nas concentrações de leptina circulantes em função do gênero, sendo de três a quatro vezes maiores em mulheres que em homens com um índice de massa corporal similar (33,36). Tais diferenças persistem mesmo quando corrigida a maior adiposidade corporal em mulheres e parece não ser explicada pelo efeito dos hormônios reprodutivos femininos, uma vez que as concentrações de leptina plasmática não diferem entre mulheres na pré e pós-menopausa, e a terapia de reposição hormonal não altera a relação entre leptina e adiposidade corporal (33). É possível que a diferença de gênero resulte da inibição por andrógenos e/ou diferenças na distribuição de gordura corporal entre homens e mulheres (2).

Assim como a insulina, a secreção e as concentrações séricas de leptina são influenciadas pela ingestão energética. As concentrações séricas de leptina diminuem na presença de dietas hipocalóricas (37,38) e durante o jejum (39,40) mesmo antes que ocorram mudanças na concentração de gordura corporal. Esse mecanismo permite que o processo de alimentação se inicie antes que os estoques de gordura corporal sejam depletados. Em contraste, as concentrações séricas de leptina aumentam após re-alimentação (41,40) ou durante a superalimentação (41).

As concentrações de insulina e leptina séricas são influenciadas pelo conteúdo de macronutrientes da dieta. Dietas hipoprotéicas, por exemplo, resultam em redução da insulina (42) e aumento de leptina (43) circulantes. Curiosamente os efeitos dessas dietas sobre o consumo alimentar são controversos. Alguns estudos têm mostrado que animais mantidos com dieta hipoprotéica apresentam aumento do consumo alimentar absoluto (44,45,46,47) e relativo (48,49), enquanto outros mostram redução (50,51) ou nenhuma alteração na ingestão alimentar (52). Menos controvertidos são os estudos relacionando o efeito de dietas hipoprotéicas sobre o teor de gordura corporal. Em geral, animais submetidos à restrição protéica apresentam proporcionalmente maior concentração de gordura corporal (43,52).

A hiperfagia, com o conseqüente aumento da gordura corporal verificada em animais submetidos à restrição protéica tem sido atribuída à deficiência de nitrogênio e aminoácidos essenciais, que o organismo tenta suprir aumentando o consumo energético (52). A resistência à leptina (43) e a superexpressão do gene de neuropeptídio Y (um potente indutor do consumo alimentar e do acúmulo de gordura corporal) (53) são outras explicações plausíveis para a alteração do comportamento alimentar e o aumento da adiposidade verificada nesses animais.

Estados fisiológicos como a gestação e a lactação, que aumentam a demanda de energia para assegurar o crescimento do feto e a produção de leite, também modificam o comportamento alimentar e a composição corporal (54).

Na lactação o aumento da necessidade de energia é suprido primariamente pelo consumo alimentar que chega a aumentar cerca de quatro vezes (acima de 60g/dia). Adicionalmente ocorrem adaptações que melhoram a eficiência metabólica favorecendo a utilização dos nutrientes pela glândula mamária (55). Roedores mostram diminuída termogênese no tecido adiposo marrom (56) para preservar combustíveis metabólicos (57) e reduzida lipogênese no tecido adiposo branco (58,59), utilizando a energia estocada na forma de gordura (60). Apesar disso, esses animais estão usualmente em balanço energético negativo moderado, mobilizando em torno de 1g de tecido adiposo por dia para suprir as necessidades nutricionais (61).

As mudanças comportamentais e metabólicas que acompanham a lactação estão correlacionadas com profundas alterações no meio hormonal. A lactação resulta em hipotireoidismo (59) que contribui para a redução da taxa metabólica basal (62). O estímulo da amamentação eleva a síntese e liberação da prolactina (63), dos hormônios adrenocorticotróficos, corticosterona (64) e progesterona (65). O neuropeptídeo Y está também elevado na lactação (66). A supressão da ciclicidade ovariana no período pós-parto é acompanhada pela redução da secreção do hormônio liberador da gonadotrofina (GnRH) (67), da liberação basal e pulsátil do hormônio luteinizante (LH) (68,69) e da concentração de estradiol (70). Como a ação desses hormônios resulta em efeitos distintos sobre o comportamento alimentar e o gasto energético, as mudanças no balanço energético observadas na lactação ainda não são bem entendidas.

É possível que tais alterações se devam a redução das concentrações séricas ou a resistência à ação dos “sinais de adiposidade”. Corroboram com a primeira hipótese os estudos que mostram em ratas lactantes, baixas concentrações séricas de insulina (71) e de leptina (72,73,55) e com a segunda os que observaram elevada concentração sérica de leptina associadas a hiperfagia em humanos e roedores (74,75).

A hipoleptinemia é o achado mais consistente na lactação e parece resultar principalmente do balanço energético negativo, mas também tem sido atribuída ao aumento do clearance sérico e à atenuação da sua ascensão noturna que se deve, ao menos em parte, ao estímulo da sucção (76). A sucção estimula a secreção da prolactina e ocitocina (77), mas este último hormônio parece ser o responsável pela diminuição da concentração de leptina sérica (78,79). A hipoinsulinemia na lactação tem sido atribuída às baixas concentrações séricas de glicose (80,81) e ao aumento do clearance desse hormônio (81). Hipoinsulinemia e hipoleptinemia são sinais que reconhecidamente levam ao aumento da síntese e liberação hipotalâmica do agente orexígeno neuropeptídio Y, pelo menos no diabetes experimental e em condições de balanço energético negativo (82,83).

São poucos os estudos que mostram aumento das concentrações séricas de leptina na lactação (74,75). Alguns pesquisadores têm atribuído a hiperleptinemia vista na lactação ao aumento da atividade de ligação da leptina ao seu receptor solúvel (OB-Re) com aumento da formação do complexo hormônio-receptor, que dificultaria o seu clearance renal (84). A grande proporção de leptina ligada aos seus receptores plasmáticos também restringiria a sua ação no SNC, desencadeando a hiperfagia (85).

A ingestão inadequada de proteínas em quantidade ou qualidade durante a lactação tem sido associada com a supressão da ingestão alimentar e a redução da performance lactacional em ratas (60,86,87,88). A concentração de gordura da carcaça parece não se modificar em função do teor de proteína da dieta (89), mas a massa corpórea magra é catabolizada na restrição protéica associada à lactação (60,90). A participação da insulina e da leptina nas alterações do comportamento alimentar e da composição corporal em ratas lactantes submetidas à dietas restritas em proteínas parece provável, porém necessita ser melhor investigada.

2. JUSTIFICATIVA

A obesidade é uma desordem nutricional de grande prevalência tanto em países ricos como naqueles em desenvolvimento (91,92,93,94). Está usualmente associada à excessiva ingestão de alimentos, motivo pelo qual o estudo dessa doença não tem sido prioridade em países emergentes, onde a desnutrição protéico-energética é um grave problema de saúde pública. Contudo, a última década foi marcada por mudanças nos padrões sócio-econômicos, demográficos e nas estruturas de saúde. Esse fenômeno tem sido definido por alguns autores como “transição nutricional” (95,96,97,98,99).

Estudos de prevalência de obesidade em adultos brasileiros têm mostrado um aumento epidêmico, especialmente entre mulheres pertencentes a classes sociais menos favorecidas (100,101,102). Embora a melhora das condições sócio-econômicas possa explicar parcialmente essa tendência, outros fatores parecem ser importantes (103).

Estados fisiológicos como a gravidez e a lactação e dietas restritas em proteínas, que alteram o comportamento alimentar e o gasto energético, favorecem o aumento da adiposidade corporal e poderiam explicar a maior prevalência de obesidade entre as mulheres.

Assim, um estudo experimental que avaliasse a influência da restrição protéica antes e durante a lactação sobre o perfil sérico de insulina e leptina, relacionando-o com o balanço energético poderia contribuir para o esclarecimento dessa questão, tendo em vista a escassez de informações sobre esses aspectos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ❑ Avaliar os efeitos da restrição protéica sobre o controle do balanço energético pela insulina e leptina em ratas lactantes.

3.2 Objetivos Específicos

- ❑ Verificar as concentrações séricas de insulina e leptina em ratas lactantes submetidas à restrição protéica.
- ❑ Determinar a ingestão alimentar em ratas lactantes submetidas à restrição protéica.
- ❑ Determinar a composição corporal de ratas lactantes submetidas à restrição protéica.
- ❑ Determinar o balanço energético ratas lactantes submetidas à restrição protéica.
- ❑ Correlacionar a insulinemia e a leptinemia com o consumo alimentar, a composição corporal e o balanço energético em ratas lactantes submetidas à restrição protéica.

4. REFERÊNCIAS

1. York, D.A. (1996) Lessons from animal models of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 25: 781-800.
2. Havel, P.J. (2001) Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med*, 226(11): 963-977.
3. Woods S.C.; Seeley R.J. (2000) Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition*, 16: 894-902.
4. Woods S.C.; Decke E.; Vasselli J.R. (1974) Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol*, 81: 26-43.
5. Schwartz M.W.; Figlewicz D.P.; Baskin K.G.; Woods S.C.; Porte D.J. (1992) Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocrinol Rev*, 13:387-414.
6. Havel P.J.; Townsend R.; Chaump L.; Teff K. (1999) High-fat meals reduce 24-h circulating leptin concentrations in women. *Diabetes*, 48:334-341.
7. Stein D.T.; Stevenson B.E.; Chester M. V.; Basit M.; Daniels M.B.; Turley S.D.; McGarry J.D. (1997) The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest*, 100: 398-403.

8. Baskin D.G.; Wilcox B.J.; Figlewicz D.P.; Dorsa D.M. (1988) Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci*, 11:107-111.

9. Schwartz M. W.; Bergman R. N.; Kahn S. E.; Taborsky G. J. J.; Fisher L. D.; Sipols A. J.; Woods S. C.; Steil G. M.; Porte D. J. (1991) Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs: quantitative aspects and implications for transport. *J Clin Invest*, 88: 1272-1281.

10. Sipols A. J.; Baskin D. G.; Schwartz M. W. (1995) Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes*, 44: 147-151.

11. Bruning J. C.; Gautam D.; Burks D. J.; Gillette J.; Schubert M.; Orban P. C.; Klein R.; Krone W.; Muller-Wieland D.; Kahn C. R. (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, 289: 2122-2125.

12. Diamond P.; LeBlanc J. (1988) A role for insulin in cephalic phase of post-prandial thermogenesis in dogs. *Am J Physiol*, 254: E625-E632.

13. Vollenweider P.; Randin D.; Tappy L.; Jequier E.; Nicod P.; Scherrer U. (1994) Impaired insulin-induced sympathetic neural activation and vasodilation in skeletal muscle in obese humans. *J Clin Invest*, 93: 2365-2371.

14. Figlewicz D. P.; Stein L. J.; West D.; Porte D. J.; Woods S.C. (1986) Intracisternal insulin alters sensitivity to CCK-induced meal suppression in baboons. *Am J Physiol*, 250: R856-R860.

15. Figlewicz D. P.; Sipols A. J.; Seeley R. J.; Chavez M.; Woods S. C.; Porte D. J. (1995) Intraventricular insulin enhances the meal-suppressive efficacy of intraventricular cholecystokinin octapeptide in the baboon. *Behav Neurosci*, 109: 567-569.

16. Kennedy A. G. (1953) The role of the fat depot in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc Roy Soc Lond B Biol Sci*, 140: 578-592.

17. Coleman D. L. (1978) Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*, 14: 141-148.

18. Zhang Y.; Proença R.; Maffei M.; Barone M.; Leopold L.; Friedman J. M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-432.

19. Chen H.; Charlat O.; Tartaglia L. A.; Woolf E. A.; Weng X.; Ellis S. J.; Lakey N. D.; Culpepper J.; Moore K. J.; Breitbart R. E.; Duyk G. M.; Tepper R. I.; Morgenstern J. P. (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell*, 84: 491-495.

20. Chua S. C. J.; Chung W. K.; Wu-Peng X. S.; Zhang Y.; Liu S. M.; Tartaglia L.; Leibel R. L. (1996) Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*, 271: 994-996.
21. Caro J. F.; Sinha M. K.; Kolaczynski J. W.; Zhang P. L.; Considine R. V. (1996) Leptin: the tale of na obesity gene. *Diabetes*, 45: 1455-1462.
22. Havel P. J. (2000) Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc*, 59: 359-371.
23. Levin N.; Nelson C.; Gurney A.; Vandlen R.; DeSauvage F. (1996) Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:1726-1730.
24. Scarpace P. J.; Matheny M.; Pollock B. H.; Turner N. (1997) Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J Physiol*, 273: E226-E220.
25. Collins S.; Kuhn C. M.; Petro A. E.; Swick A. G.; Chrnyk B. A.; Surwit R. S. (1996) Role of leptin in fat regulation. *Nature*, 380: 677.
26. Haynes W. G.; Morgan D. A.; Walsh S. A.; Mark A. L.; Sivitz W. I. (1997) Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest*, 100: 270-278.

27. Niswender K. D.; Morton G. J.; Stearns W. H.; Rhodes C. J.; Myers M. G. J.; Schwartz M. W. (2001) Intracellular signaling: key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature*, 413: 794-795.
28. Porte D. J.; Baskin D. G.; Schwartz M. W. (2002) Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev*, 60: S20-S29.
29. Niswender K. D.; Schwartz M. W. (2003) Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol*, 24:1-10.
30. McMinn J. E.; Sindelar D. K.; Havel P. J.; Schwartz M. W. (2000) Leptin deficiency induced by fasting impairs the satiety response to cholecystokinin. *Endocrinol*, 141: 4442-4448.
31. Maffei M.; Halaas J.; Ravussin E.; Pratley R. E.; Lee G. H.; Zhang Y.; Fei H.; Kim S.; Lallone R.; Ranganathan S. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, 1: 1155-1161.
32. Considine R. V.; Sinha M. K.; Heiman M. L.; Kriauciunas A.; Stephens R. W.; Nyce M. R.; Ohannesian J. P.; Marco C. C.; McKee I. J.; Baneer T. L.; Caro J.F. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334: 292-295.

33. Havel P. J.; Kasim-Karakas S.; Mueller W.; Johnson P. R.; Gingerich R. L.; Stern J. S. (1996) Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 4406-4413.
34. Ahren B.; Mansson S.; Gingerich R. L.; Havel P. J. (1997) Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am J Physiol*, 273: R113-R120.
35. Landt M.; Gingerich R. L.; Havel P. J.; Mueller W. M.; Schoner B.; Hale J. E. Heiman M. L. (1998) Radioimmunoassay of rat leptin: sexual dimorphism reversed from humans. *Clin Chem*, 44: 565-570.
36. Hickey M. S.; Israel R. G.; Gardiner S. N.; Considine R. V.; McCammon M. R.; Tyndall G. L.; Houmard J. A.; Marks R. H.; Caro J. F. (1996) Gender differences in serum leptin levels in humans. *Biochem Mol Med*, 59: 1-6.
37. Keim N. L.; Stern J. S.; Havel P. J. (1998) Relation between circulating leptin concentrations and appetite during a prolonged, moderate energy deficit in women. *Am J Clin Nutr*, 68: 794-801.
38. Dubuc G. R.; Phinney S. D.; Stern J. S. Havel P. J. (1998) Changes of serum leptin and endocrine and metabolic parameters after 7 days of energy restriction in men and women. *Metabolism*, 47: 429-434.

39. Boden G.; Chen X.; Mozzoli M.; Ryan I. (1996) Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 3419-3423.
40. Weigle D. S.; Duell P. B.; Connor W. E.; Steiner R. A.; Soules M. R.; Kuijper J. L. (1997) Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 82:561-565.
41. Kolaczynski J. W.; Considine R. V.; Ohannesian J.; Marco C.; Opentanova I.; Nyce M. R.; Myint M.; Caro J. F. (1996) Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketone themselves. *Diabetes*, 45: 1511-1515.
42. Ferreira F.; Barbosa H. C. L.; Stoppiglia L. F.; Delghingaro-Augusto V.; Pereira E. A.; Boschero A. C.; Carneiro E. M. (2004) Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA α expression. *J Nutr*, 134: 63-67.
43. Du F.; Higginbotham D. A.; White B. D. (2000) Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr*, 130: 514-521.
44. Swick R. W.; Gribskov C. L. (1983) The effect of dietary protein levels on diet-induced thermogenesis in the rat. *J Nutr*, 113: 2289-2294.
45. Colombo, J. P.; Cervantes, H.; Kokorovic M.; Pfister U.; Perritaz R. (1992) Effects of dietary protein on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in the rats. *Ann Nutr & Metabol*, 36: 23-33.

46. Deschepper, K.; DeGroot G. (1995) Effects of dietary protein, essential and non-essential amino acids on the performance and carcass composition of male broiler chickens. *British Poultry Sci*, 36: 229-245.
47. White B. D.; Dean R. G.; Martin R. J. (1998) Na association between low levels of dietary protein, elevated NPY gene expression in the basomedial hypothalamus and increase food intake. *Nutr Neurosci*, 1: 173-182.
48. Rothwell N. J.; Stock M. J. (1987) Influence of carbohydrate and fat intake on diet-induced thermogenesis and brown fat activity in rats fed low protein diets. *J Nutr*, 117: 1721-1726.
49. Zhao X. Q.; Jorgensen H.; Gabert V. M.; Eggum B. O. (1996) 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*, 126: 2036-2043.
50. Beck B.; Dollet J. M.; Max J. P. (1989) Refeeding after various times of ingestion of a low protein diet: effects on food intake and body weight in rats. *Physiol Behav*, 45: 761-765.
51. Mercer L. P.; Kelley D. S.; Humphries L. L.; Dunn J. D. (1994) Manipulation of central nervous system histamine or histaminergic receptors (H1) affects food intake in rats. *J Nutr*, 124: 1029-1036.

52. White B. D.; Porter M. H.; Martin R. J. (2000) Protein selection, food intake, and body composition in response to the amount of dietary protein. *Physiol Behav*, 68(5): 673-681.
53. White B. D.; He B.; Dean R. G.; Martin R. J. (1994) Low protein diets increase neuropeptide y gene expression in the basomedial hypothalamus of rats. *J Nutr*, 124: 1152-1160.
54. Mistry A. M.; Romsos D. R. (2002) Intracerebroventricular leptin administration reduces food intake in pregnant and lactating mice. *Exp Biol Med*, 227(8): 616-619.
55. Denis R. G. P.; Williams G.; Vernon R. G. (2003) Regulation of serum leptin and its role in the hyperphagia of lactatopm om the rat. *J Endocrinol*, 176: 193-203.
56. Trayhurn P. (1989) Thermogenesis and the energetics of pregnancy and lactation. *Can J Physiol Pharm*, 67: 370-375.
57. Trayhurn P.; Richard D. (1985) Brow adipose tissue thermogenesis and the energetics of pregnancy and lactation in rodents. *Biochem Soc Trans*, 13: 826-828.
58. McNamara J. P. (1995) Role and regulation of metabolism in adipose tissue during lactation. *Nutr Biochem*, 6: 120-129.
59. Vernon R. G.; Pond C. M. (1997) Adaptations of maternal adipose tissue to lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2: 231-241.

60. Naismith D. J.; Richardson D. P.; Pritchard A. E. (1982) The utilization of protein and energy during lactation in the rat, with particular regard to the utilization of fat accumulated during pregnancy. *Br J Nutr*, 48: 433-441.
61. Barber M. C.; Clegg R. A.; Travers M. T.; Vernon R. G. (1997) Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Bioch Biophys Acta*, 1347: 101-126.
62. Shetty P. S. (1990) Physiological mechanisms in the adaptive response of metabolic rates to energy restriction. *Nutr Res Rev*, 3: 49-74.
63. Amenomori Y.; Chen C. L.; Meites J. (1970) Serum prolactin levels in rats during different reproductive states. *Endocrinol*, 86: 506-510.
64. Voogt J. L.; Sar M.; Meites J. (1969) Influence of cycling, pregnancy, labor and suckling on corticosterone- ACTH levels. *Am J Physiol*, 216: 655-658.
65. Grota L. G.; Eik-Nes K. L. (1967) Plasma progesterone concentration during pregnancy and lactation in the rat. *J Reprod Fertil*, 13: 83-91.
66. Malabu U. H.; Kilpatrick A.; Ware M.; Vernon R. G.; Williams G. (1994) Increased neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of lactating rats: Possible relations to hyperphagia and adaptive changes in energy balance. *Peptides*, 15: 83-87.

67. Fox S. R.; Smith M. S. (1984) The suppression of luteinizing hormone secretion during lactation in the rat. *Endocrinol*, 115: 2041-2045.
68. Ford J. J.; Melampy R. M. (1973) Gonadotropin levels in lactating rats: Effects of ovariectomy. *Endocrinol*, 93: 540-547.
69. Tsukamura H.; Ohkura S.; Maeda K. L. (1992) The endogenous opioids do not mediate the suckling-induced suppression of LH secretion in lactating rats. *J Reprod Dev*, 38: 159-164.
70. Smith M. S.; Neill J. D. (1977) Inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat: relative contribution of suckling and ovarian steroids. *Biol Reprod*, 17: 255-261.
71. Vernon R. G. (1989) Endocrine control of metabolic adaptation during lactation. *Proc Nutr Soc*, 48: 23-32.
72. Brogan R. S.; Mitchell S. E.; Trayhurn P.; Smith M. S. (1999) Suppression of leptin during lactation: contribution of the suckling stimulus versus milk production. *Endocrinol*, 140: 2621-2627.
73. Woodside B.; Abizaid A.; Walker C. D. (2000) Changes in leptin levels during lactation: implications for lactational hyperphagia and anovulation. *Horm Behav*, 37: 353-365.

74. Mukherjea R.; Castonguay T. W.; Douglass L. W.; Moser-Veillon P. (1999) Elevated leptin concentrations in pregnancy and lactation: possible role as a modulator of substrate utilization. *Life Sciences*, 65(11): 1183-1193.
75. Mistry A. M.; Romsos D. R. (2002) Intracerebroventricular leptin administration reduces food intake in pregnant and lactating mice. *Exp Biol Med*, 227(8): 616-619.
76. Vernon R. G.; Denis R. G. P.; Sorensen A.; Williams G. (2002) Leptin and the adaptations of lactation in rodents and ruminants. *Horm Metab Res*, 34: 678-685.
77. LeMagnen J. (1984) Metabolic and feeding patterns: role of sympathetic and parasympathetic efferent pathways. *J Autonomic Nerv Syst*, 10: 325-335.
78. Fain J. N.; Bahouth S. W. (1998) Hormonal regulation of 18S RNA, leptin mRNA, and leptin release in adipocytes from hypothyroid rats. *Metabolism*, 47: 1455-1461.
79. Gualillo O.; Lago F.; Garcia MI; Menendex C.; Senaris R.; Casanueva F. F.; Dieguez C. (1999) Prolactin stimulates leptin secretion by rat white adipose tissue. *Endocrinol*, 140: 5149-5153.
80. Robinson A. M.; Girard J. R.; Williamson D. H. (1978) Evidence for a role of insulin in the regulation of lipogenesis in lactating rat mammary gland. Measurements of lipogenesis *in vivo* and plasma hormone concentrations in response to starvation and refeeding. *Biochem J*, 176(1): 343-346.

81. Jones R. G.; Ilic V.; Williamson D. H. (1984) Physiological significance of altered insulin metabolism in the conscious rat during lactation. *Biochem J*, 220:455-460.
82. Sahu A.; Sninsky C. A.; Phelps C. P.; Dube M. G.; Kalra P. S.; Kalra S. P. (1992) Neuropeptide Y release from the paraventricular nucleus increases in association with hyperphagia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Endocrinol*, 131: 2979-2985.
83. Hahn R. M.; Breninger J. F.; Baskin D. G.; Schwartz M. W. (1998) Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci*, 1: 271-272.
84. Cumin F.; Baum H. P.; Levens N. (1997) Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney. *J Endocrinol*, 155: 577-585.
85. Huang L.; Wang Z.; Li C. (2001) Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem*, 276: 6343-6349.
86. Jansen G. R.; Hunsaker H. (1986) Effect of dietary protein and energy on protein synthesis during lactation in rats. *J Nutr*, 116: 957-968.
87. Friggens N. C. (1990) The effects of feed composition and level on lactational performance in rats and dairy cows: a basic approach to feed description. PhD Thesis, University of Edinburgh.

88. Cambraia R. P.; Vannucchi H.; De-Oliveira L. M. (1997) Food intake and weight of lactating rats maintained on different protein-calorie diets, and pup growth. *Braz J Med Biol Res*, 30(8): 985-988.
89. Pine A. P.; Jessop N. S.; Oldham J. D. (1994) Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. *Br J Nutr*, 71: 13-27.
90. Naismith D. J.; Robinson S. M. (1987) Adaptations in protein metabolism during lactation in the rat. *Br J Nutr*, 58: 533-538.
91. Monteiro C. A.; Benício M. H.; Iunes R.; Gouveia N. C. (1992) Nutritional status in Brazilian children: trends from 1975 to 1989. *Bull World Health Org*, 70: 657-666.
92. Monteiro C. A.; Mondini L.; Souza A. L. M.; Popkin B. M. (1995) The nutrition transition in Brazil. *Eur J Clin Nutr*, 49: 105-113.
93. Flegal K. M.; Carrol M. D.; Kuczmarski R. J.; Johnson C. L. (1998) Overweight and obesity in the United States: prevalence trends, 1960-1994. *Intern J Obes*, 22: 39-47.
94. Popkin B. M.; Doak C. (1998) The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. *Nutr Rev*, 56: 95-103.
95. Popkin B. M. (1994) The nutrition transition in low income countries: an emerging crisis. *Nutr Rev*, 52: 285-298.

96. Sichieri R.; Coitinho D.; Leao M.; Recine E.; Everthard J. E. (1994) High temporal, geographic, and income variation in body mass index among adults in Brazil. *Am J Public Health*, 84: 793-806.

97. Monteiro C. A. (Ed.) (1995) 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, 247-255.

98. Popkin B. M.; Richard M. K.; Monteiro C. A. (1996a) Stunting is associated with overweight in children of four nations that are undergoing the nutrition transition. *J Nutr*, 126: 3009-3016.

99. Popkin B. M.; Zohoori N.; Baturin A. (1996b) Elderly nutritions, in Russian: is there a public health problem? *Am J Public Health*, 86: 355-360.

100. Coitinho D. C. (1998) 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.

101. Florêncio T. T. (1998) Obesity in adult population residing in a “sem teto”- homeless encampment in the northeast of Brazil. *Intern J Obes*, 22: 245S.

102. Monteiro C. A.; Mondini L. (1997) The changing nature of nutrition disorders in the developing countries: the case of Brazil. Proceedings of the 16th International Congress of Nutrition, Montreal: Canadian Federation of Biological Sciences, 263-265.
103. Popkin B. M.; Bisgrove E. S. (1988) Urbanization and nutrition in low-income countries. Food Nutr Bull, 10: 3-23.

Os resultados desta dissertação são apresentados a seguir no formato de artigo científico, com o título “*Serum leptin and insulin levels in lactating protein restricted rats: Implications for energy balance*”, uma vez que estes já foram submetidos à publicação na revista **Nutrition** no dia 25/05/2005.

Concentrações Séricas de Leptina e Insulina em Ratas Lactantes Submetidas à Restrição
Protéica: Implicações para o Balanço Energético

Running head: Dieta hipoprotéica e balanço energético durante a lactação

Cristiane Lopes Pinto Ferreira¹, Gláucia da Silva Macêdo¹, Márcia Queiroz Latorraca¹, PhD,
Vanessa Cristina Arantes¹, MSc, Roberto Vilela Veloso¹, MSc, Everardo Magalhães
Carneiro², PhD, Antonio Carlos Boschero², PhD, Cláudia Maria Oller do Nascimento³, PhD,
and Maria Helena Gaíva¹, PhD.

¹*Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de
Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil*

²*Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de
Campinas, Campinas, SP, Brasil*

³*Departamento de Fisiologia da Nutrição, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo,
SP, Brasil.*

AGRADECIMENTOS: Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação de
Pesquisas de Mato Grosso FAPEMAT (Processo nº175/04), CNPq (Processo nº.
479138/2003-6) e FINEP/PRONEX (Processo nº134/97). C.L.P. Ferreira recebeu bolsa de
pesquisa da CAPES.

Enviar correspondências para o endereço:

Maria Helena Gaíva Gomes da Silva

Universidade Federal de Mato Grosso - Departamento de Alimentos e Nutrição – FANUT

Avenida Fernando Corrêa da Costa, S/N Coxipó - Cuiabá, MT, Brazil Cep: 78060-900

Telephone: +55 65 615-8816

Fax: +55 65 615-8811

E-mail: marihele@cpd.ufmt.br

INTRODUÇÃO

Em animais adultos e humanos, o peso corporal tende a permanecer dentro de uma escala relativamente estreita, apesar de grandes flutuações diárias na quantidade de alimento consumido. Apesar dessas observações nós temos verificado o aumento da obesidade no mundo todo. Estudos de prevalência na população adulta brasileira têm mostrado um aumento epidêmico da obesidade, principalmente entre mulheres de baixa classe social [1-4]. Embora a melhoria nas condições econômicas possa explicar em parte tais tendências, é possível que outros fatores sejam também importantes [5].

Dieta hipoprotéica está usualmente associada à hiperfagia [6,7], aumento do conteúdo de gordura corporal [6,8] e a numerosas adaptações tais como, elevação da taxa metabólica basal [9], da termogênese do tecido adiposo marrom [10] e da lipogênese do tecido adiposo branco [11]. Mudanças dramáticas no comportamento alimentar e no metabolismo são também vistas na lactação, como hiperfagia [12], redução na taxa metabólica basal [13], na termogênese do tecido adiposo marrom [14] e na lipogênese do tecido adiposo branco [15,16], essas alterações garantem a alta demanda energética para a produção de leite.

As alterações metabólicas e no comportamento alimentar verificadas na restrição protéica e na lactação, correlacionam-se igualmente com profundas alterações nas concentrações circulantes de insulina e leptina [17,18], dois hormônios envolvidos na regulação do balanço energético e que poderiam promover a obesidade.

Assim, no presente estudo, nós avaliamos se a restrição protéica afeta as concentrações de insulina e leptina, e o papel desses hormônios no balanço energético no pico da lactação.

MATERIAS E MÉTODOS

1. Animais e dietas

O experimento seguiu as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), adaptado pela Universidade Federal de Mato Grosso. Trinta e uma ratas fêmeas *Wistar* (90 dias), foram fornecidas pelo biotério central da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá – Brasil. O acasalamento foi feito abrigando machos e fêmeas durante a noite e a prenhez foi confirmada através do esfregaço vaginal e verificação da presença de espermatozóides. Fêmeas virgens e prenhes foram separadas aleatoriamente em gaiolas individuais e mantidas do primeiro dia de prenhez ao décimo quarto dia de lactação com dieta isocalórica contendo 6% de proteína (dieta hipoprotéica) ou 17% de proteína (dieta controle) como descrita na Tabela 1. Quatro grupos de ratas foram usados neste estudo: controle não lactante (CNL), controle lactante (CL), hipoprotéica não lactante (HPNL), e hipoprotéica lactante (HPL). Durante todo o período experimental, as ratas tiveram livre acesso à água e à dieta e foram mantidas em ambiente com temperatura de 24 ± 1 °C e um ciclo claro/escuro de 12h. O consumo alimentar e o peso corporal foram monitorados três vezes por semana. O nascimento ocorreu no 22º dia de prenhez, e após três dias de idade, as crias foram reduzidas a oito filhotes, assegurando assim, um tamanho padrão de crias para cada mãe.

2. Coleta e análise das amostras

No final do período experimental (14º dia de lactação), as ratas foram sacrificadas por decapitação. Amostras de sangue foram coletadas, o soro foi obtido por centrifugação e alíquotas foram usadas para medir as concentrações séricas de glicose [19], proteína total [20], albumina [21], insulina [22] e leptina (Kits Cristal Chem. Inc., Chicago, IL, USA). Os

tecidos adiposos branco retroperitoneal (RET) e gonadal (GON) e o tecido adiposo marrom (TAM) foram rapidamente removidos para determinação do peso fresco.

3. Medidas da composição da carcaça e ingestão energética

As carcaças foram evisceradas, pesadas e armazenadas a -20°C para posterior análise de composição. O conteúdo de água da carcaça foi medido através de secagem em estufa a 80°C até obtenção do peso constante. A água corporal foi determinada pela diferença entre o peso da carcaça úmida e seca. A gordura da carcaça foi medida pela extração em éter de petróleo usando um extrator de gordura *Soxlet* contínuo. O conteúdo de gordura foi calculado pela subtração da massa seca livre de gordura, do peso da carcaça seca. O conteúdo de cinzas foi estimado, seguindo combustão a 550°C até a obtenção do peso constante. O conteúdo de proteína foi determinado subtraindo o conteúdo de água, gordura e cinzas, do peso fresco da carcaça.

Para calcular a energia da carcaça e a energia ingerida nós assumimos que o conteúdo de energia, de proteína e carboidrato sendo de 16,74 Kj/g e de gordura sendo de 37,7 Kj/g. A composição da carcaça no início da lactação (cálculo da energia de base) foi estimada pela relação entre componentes da carcaça de fêmeas sob similar tratamento dietético e o mesmo estado fisiológico ao final da prenhez, usando o peso corporal das ratas no 1º dia de lactação.

Da diferença entre a composição final e a composição inicial da carcaça, o balanço lipídico, o balanço protéico, o balanço energético, a eficiência energética (a razão entre o balanço energético e a energia ingerida) e o gasto energético (a diferença entre a ingestão energética e o balanço energético), foram calculados.

4. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM para o número de ratos (n) indicado. Inicialmente, o teste Levene's para a homogeneidade das variâncias foi usado para verificar o ajuste dos dados para a análise de variação paramétrica. Quando necessário, foi usado uma transformação Box-Cox para corrigir a heterogeneidade das variâncias ou não-normalidade [23]. Todos os dados foram subsequentemente analisados pela 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 regressão linear simples foram usadas para examinar a relação entre as concentrações de leptina ou de insulina séricas 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 Software* (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS

Parâmetros bioquímicos e hormonais

No 14º dia de lactação as concentrações séricas de proteína total e glicose não diferiram entre os grupos. Em ambos os estados nutricionais, ratas lactantes tiveram menores concentrações de albumina que ratas não lactantes ($F_{1,27} = 15,71$, $p < 0,001$). Insulina sérica basal foi igual nos grupos HPL e HPNL e, significativamente maior em ratas CL comparado aos grupos HPL, HPNL e CNL ($p < 0,01$). As concentrações séricas de leptina não diferiram entre os grupos HPL e HPNL e foi menor no grupo CL comparado aos grupos CNL, HPL e HPNL ($p < 0,01$) (Tabela 2).

Peso corporal e consumo alimentar

A lactação aumentou significativamente o consumo alimentar total e, conseqüentemente, a ingestão total de energia e de proteína em ambos os estados nutricionais. Entretanto, esses foram menores no grupo HPL comparado ao grupo CL ($p < 0,001$). Quando expressos por grama de peso corporal, o consumo alimentar não diferiu entre os grupos HPL e HPNL, mas foi maior no CL comparado ao grupo CNL ($p < 0,001$) (Tabela 3).

A relação entre ingestão energética e concentração sérica de insulina, ingestão energética e níveis de leptina estão mostradas nas Figuras 1A e B, respectivamente. Em ratas lactantes, houve uma correlação positiva significativa entre concentrações séricas de insulina e ingestão energética ($r = 0,82$, $p < 0,001$) e relação negativa entre concentração sérica de leptina e ingestão energética ($r = -0,83$, $p < 0,001$). Essas correlações foram ausentes em ratas não lactantes para insulina sérica ($r = -0,15$, $p = 0,606$) e para leptina sérica ($r = 0,04$, $p = 0,879$). Quando os dados dos grupos não lactantes e lactantes foram associados, a ingestão energética

foi diretamente correlacionada com as concentrações séricas de insulina ($r=0,44$, $p<0,02$), mas não com a leptina ($r=-0,32$, $p<0,09$).

Composição da carcaça e balanço energético

Independentemente do estado nutricional, ratas lactantes tiveram pesos corpóreos maiores no início do período experimental ($F_{1,27}= 19,58$, $p<0,001$) e menor no 14º dia de lactação comparadas às ratas não lactantes ($F_{1,27}= 4,91$, $p<0,03$). O peso fresco da carcaça e o conteúdo de proteína da carcaça também foram menores em ratas lactantes do que em ratas não lactantes, em ambos os estados nutricionais ($F_{1,27}= 8,79$, $p<0,006$ e $F_{1,27}= 5,70$, $p<0,024$, respectivamente). O conteúdo de gordura da carcaça foi, significativamente afetado pela lactação ($F_{1,27}= 18,81$, $p<0,001$) e pelo conteúdo de proteína dietética ($F_{1,27}= 24,39$, $p<0,001$), mas não houve interação entre esses fatores ($F_{1,27}= 1,97$, $p=0,172$). Assim, o conteúdo de gordura da carcaça das ratas lactantes foi menor do que nas ratas não lactantes, e maior nos grupos restritos em proteína, do que nos grupos controles. O conteúdo de água e cinzas da carcaça não diferiu entre os grupos. Também, nenhuma diferença foi evidenciada entre os grupos quando os conteúdos de proteína e cinzas foram expressos em valores relativos. As proporções de gordura e água na carcaça foram afetadas pelo estado fisiológico ($F_{1,27}= 13,06$, $p<0,001$ e $F_{1,27}= 16,46$, $p<0,001$, respectivamente) e pelo estado nutricional ($F_{1,27}= 27,41$, $p<0,001$ e $F_{1,27}= 29,56$, $p<0,001$), mas não houve interação entre esses fatores ($F_{1,27}= 2,778$, $p=0,107$ e $F_{1,27}= 2,024$, $p=0,166$). Portanto ratas lactantes exibiram menor proporção de gordura e maior proporção de água na carcaça, que ratas não lactantes. Em contraste, ratas submetidas à restrição protéica tiveram maior percentual de gordura e menor proporção de água na carcaça que ratas controles (Tabela 4).

Os depósitos de gordura no RET e no GON foram significativamente afetados pela lactação ($F_{1,27}= 8,90$, $p<0,005$ e $F_{1,27}= 33,16$, $p<0,001$, respectivamente) e pela restrição

protéica ($F_{1,27}= 4,90$, $p<0,03$ e $F_{1,27}= 15,33$, $p<0,001$) em valores absolutos, mas não pela interação do estado nutricional e estado fisiológico ($F_{1,27}= 0,003$, $p= 0,953$ e $F_{1,27}=0,28$, $p= 0,603$, respectivamente). Foram observados resultados similares em valores relativos na lactação ($F_{1,27}= 6,24$, $p<0,019$ e $F_{1,27}= 42,24$, $p<0,001$, respectivamente) e na restrição protéica ($F_{1,27}= 4,84$, $p<0,03$ e $F_{1,27}=20,68$, $p<0,001$, respectivamente) e na interação entre o estado nutricional e estado fisiológico ($F_{1,27}= 0,30$, $p= 0,582$ e $F_{1,27}=0,04$, $p= 0,831$, respectivamente). Assim, os pesos dos depósitos de gordura nas ratas lactantes foram menores que nas ratas não lactantes, e maiores nos grupos submetidos à restrição protéica que nos grupos controles. O peso do TAM foi modificado somente pelo estado nutricional em valores absolutos ($F_{1,26}= 14,02$, $p<0,001$) e em valores relativos ($F_{1,26}= 10,42$, $p<0,001$). Ratas HPL e HPNL exibiram peso absoluto do TAM maior, comparado às ratas CL e CNL, independente do estado fisiológico. Estes resultados foram confirmados quando expressos como percentual de peso corporal (Tabela 5).

Concentrações séricas de leptina foram diretamente correlacionadas com o conteúdo de lipídio da carcaça ($r=0,63$, $p<0,001$) e os pesos do RET ($r=0,55$, $p<0,002$), GON ($r=0,50$, $p<0,007$) e TAM ($r=0,43$, $p<0,022$). Em contraste, houve uma relação inversa entre concentrações séricas de insulina e conteúdo de gordura da carcaça ($r= -0,62$, $p<0,001$), peso do RET ($r= -0,54$, $p<0,001$) e peso do GON ($r= -0,56$, $p<0,002$). As concentrações séricas de insulina não se correlacionaram com o peso do TAM ($r= -0,35$, $p=0,070$).

As ratas do grupo HPL tiveram ingestão energética menor, mas energia da carcaça maior que as ratas do grupo CL. O balanço energético foi influenciado pelo estado nutricional ($F_{1,27}= 30,86$, $p<0,001$), pela lactação ($F_{1,27}= 113,04$, $p<0,001$), e pela interação entre ambos os fatores ($F_{1,27}=8,82$, $p<0,006$). Assim, houve um balanço energético negativo nas ratas lactantes, mas em menor severidade no grupo HPL que no grupo CL. O balanço energético foi negativamente correlacionado com a ingestão energética em ratas lactantes ($r= -0,81$,

$p<0,001$) e quando os dados de ambos os grupos foram combinados ($r= -0,87$, $p<0,001$). Esta correlação foi mais fraca somente nas ratas não lactantes ($r=0,44$, $p=0,117$).

Foi observada uma considerável perda de energia da carcaça como lipídio nos grupos HPL e CL, entretanto em menor severidade no primeiro que no último grupo ($p<0,001$). Independente do estado nutricional, ratas lactantes apresentaram redução de energia da carcaça como proteína em relação às não lactantes ($F_{1,27}= 28,13$, $p<0,001$).

O gasto energético, calculado pelo método do balanço energético, foi significativamente afetado pelo estado nutricional ($F_{1,27}=31,08$, $p<0,001$), estado fisiológico ($F_{1,27}=443,13$, $p<0,001$), e pela interação entre esses fatores ($F_{1,27}=39,16$, $p<0,001$). Assim, o gasto energético foi significativamente maior em ratas lactantes, mas menor no grupo HPL comparado ao grupo CL ($p<0,001$). A eficiência energética foi modificada de forma significativa, pela lactação ($F_{1,27}=90,01$, $p<0,001$) e pelo estado nutricional ($F_{1,27}=20,78$, $p<0,001$), mas nenhum efeito de interação desses fatores foi verificado ($F_{1,27}=2,15$, $p= 0,154$). Conseqüentemente, a eficiência energética foi reduzida pela lactação e aumentada pela restrição protéica (Tabela 6).

Houve uma relação positiva entre o gasto energético e as concentrações séricas de insulina ($r=0,89$, $p<0,001$) e correlação negativa entre gasto energético e as concentrações séricas de leptina ($r= -0,87$, $p<0,001$) em ratas lactantes, mas essas correlações foram mais fracas em ratas não lactantes (Figuras 1C e D). Quando os dados de ratas não lactantes e lactantes foram agrupados, o gasto energético correlacionou-se diretamente com as concentrações séricas de insulina ($r=0,53$, $p<0,004$) e, inversamente com as concentrações séricas de leptina ($r=-0,46$, $p<0,012$).

DISCUSSÃO

Ratas alimentadas com dieta hipoprotéica não exibiram as características típicas da desnutrição protéica tais como baixo peso corporal e hipoalbuminemia. Entretanto, com a lactação, os “sinais de adiposidade” (concentrações séricas de insulina e leptina) diferiram em função do teor de proteína da dieta. Ratas lactantes submetidas à restrição protéica tiveram insulinemia basal similar às não lactantes, enquanto as controles lactantes apresentaram concentrações séricas de insulina maior em comparação as controles não lactantes.

As concentrações séricas de leptina também não diferiram entre ratas lactantes e não lactantes submetidas à restrição protéica, enquanto naquelas lactantes alimentadas com dieta controle a leptinemia foi reduzida em 50% em relação às controles não lactantes. Conseqüentemente, as concentrações séricas de leptina foram maiores em ratas HPL em relação às ratas CL. Embora alguns estudos não tenham encontrado mudanças na leptina sérica em ratas lactantes [24,25], outros mostram uma redução de 20-75% na leptina sérica no período diurno durante a lactação [26-28]. Existem algumas razões possíveis para a elevada concentração de leptina sérica verificada em ratas lactantes submetidas à restrição protéica. Uma explicação diz respeito à baixa taxa de produção de leite nessas ratas [29], uma vez que o tratamento de ratas lactantes com droga que suprime a secreção de prolactina e a produção de leite (bromocriptina) [12,30] aumenta as concentrações séricas de leptina [12]. Uma segunda explicação seria a diminuição da taxa de *clearance* do hormônio, devido ao fluxo sanguíneo e débito cardíaco reduzidos e/ou a menor produção de leite [31]. Esta suposição é reforçada pelo fato de que a taxa de *clearance* da leptina que está aumentada em ratas lactantes normais é compatível com o alto débito cardíaco durante a lactação [32], e que a leptina é também secretada no leite [33]. Finalmente, a síntese aumentada do hormônio pelo tecido adiposo branco poderia contribuir para a hiperleptinemia, uma vez que a leptina é

sintetizada predominantemente por este tecido e em quantidade proporcional aos estoques de gordura corporal [34,35]. Em nosso estudo ratas alimentadas com dieta hipoprotéica tiveram um aumento significativo nos depósitos de gordura no RET e GON, bem como um elevado conteúdo de gordura na carcaça. Além disso, as concentrações séricas de leptina correlacionaram-se diretamente com o conteúdo de gordura na carcaça, os pesos dos tecidos adiposos RET e GON, explicando a elevada síntese de leptina em ratas alimentadas com dieta hipoprotéica. A maior adiposidade em ratas submetidas à restrição protéica pode ser consequência da alta sensibilidade dos adipócitos à insulina, com consequente aumento da síntese de lipídeos e inibição de sua degradação. Esta conclusão está de acordo com observações prévias mostrando que a hipoinsulinemia foi associada com um aumento na sensibilidade à insulina no tecido adiposo de ratas mantidas com dieta hipoprotéica [36,37]. Em concordância, nossos resultados mostraram uma correlação inversa entre insulinemia e conteúdo de gordura na carcaça, pesos do RET e GON. Alta sensibilidade dos adipócitos à insulina poderia também contribuir para o aumento da biossíntese e secreção de leptina. Estudos *in vitro* mostraram que a insulina age diretamente nos adipócitos, aumentando as concentrações de mRNA e a secreção de leptina [38,39], talvez devido ao aumento do transporte e metabolismo da glicose [40]. Por outro lado, a aumentada sensibilidade periférica à insulina pode ser resultado das altas concentrações de leptina, visto que a administração de leptina, tanto centralmente quanto periféricamente, aumenta a utilização da glicose estimulada pela insulina por tecidos periféricos de ratos normais [41,42]. Finalmente, o balanço energético negativo verificado em nossas ratas lactantes mantidas com dieta hipoprotéica, poderia estar envolvido. O balanço energético negativo parece ser o maior fator responsável pela hipoleptinemia da lactação [43]. Confirmando esta suposição, nós observamos que as concentrações séricas de leptina foram diretamente relacionadas ao balanço energético

somente em ratas lactantes. Além disso, ratas HPL que apresentaram altos níveis deste hormônio, também tiveram um balanço energético menos negativo.

Hipoleptinemia durante a lactação pode dirigir ou, ao menos facilitar a hiperfagia [43]. Neste estudo, ratas HPL que tiveram altas concentrações séricas de leptina e menores níveis séricos de insulina, ingeriram menor quantidade de dieta (em valores absolutos e quando expressos por grama de peso corporal), que ratas CL com menores concentrações séricas de leptina e altos níveis séricos de insulina. Em ratas lactantes houve uma correlação negativa significativa entre leptina sérica e ingestão energética, mas esta correlação foi ausente tanto em ratas não lactantes ou quando os dados de ratas não lactantes e lactantes foram agrupados. A relação entre ingestão energética e insulina sérica não foi significativa em ratas não lactantes, entretanto houve uma correlação positiva em ratas lactantes e na combinação dos dados de ambos os grupos. Além disso, a ingestão energética foi relacionada negativamente com o balanço energético em ratas lactantes. Estes achados sugerem que: 1) na lactação normal ocorre resistência periférica a insulina [44] que contribui para o balanço energético negativo, levando a hipoleptinemia que, junto com a resistência hipotalâmica à insulina, resulta em hiperfagia. 2) restrição protéica durante a lactação reduz os níveis séricos de insulina favorecendo o aumento da sensibilidade periférica ao hormônio, que contribui para a maior deposição de gordura materna e hiperleptinemia. Os altos níveis séricos de leptina associados ao aumento da sensibilidade hipotalâmica à insulina, diminuiu o consumo alimentar.

Estudos têm mostrado que o alto custo energético da lactação é suprido pelo aumento da ingestão alimentar associado à utilização dos estoques de gordura [45] e também à conservação de combustíveis metabólicos devido à redução da termogênese no tecido adiposo marrom [46]. Na restrição protéica, embora ocorra hiperfagia, esta é acompanhada por uma menor eficiência energética e um aumento do gasto energético, na tentativa de dissipar o

excesso de energia [47]. Essas mudanças na eficiência metabólica parecem resultar da termogênese adaptativa induzida pela dieta associada ao aumento da atividade do tecido adiposo marrom [10]. Neste estudo, ratas HPL tiveram gasto energético e depleção nas reservas de energia como gordura menores em relação às ratas CL. Curiosamente os grupos mantidos com dieta hipoprotéica exibiram uma melhor eficiência energética, possivelmente devido à hipofagia que resultou na diminuição do gasto energético, numa tentativa aparente de conservar energia.

A mudança na eficiência metabólica não parece ter resultado da termogênese adaptativa induzida pela dieta, a julgar pelo peso do tecido adiposo marrom maior nas ratas mantidas com dieta hipoprotéica, uma possível indicação de maior atividade metabólica neste tecido [10]. Tampouco, parece resultar da redução da taxa metabólica basal, uma vez que esta alteração está relacionada entre outros fatores, às baixas concentrações de hormônios tireoideanos. Em nosso caso, o hipotireoidismo poderia ser descartado, pois pelo menos na lactação, essa alteração está associada à hipoleptinemia [48].

Além da hipofagia, a hipoinsulinemia é outro candidato para explicar o reduzido gasto energético, visto que este foi diretamente correlacionado com insulina sérica, e negativamente correlacionado com leptina sérica. Portanto, as baixas concentrações séricas de insulina, poderiam determinar o aumento da sensibilidade dos adipócitos ao hormônio, e consequentemente, elevar a lipogênese no tecido adiposo branco.

Assim, ratas submetidas à restrição protéica durante a prenhez e a lactação mostraram no pico da lactação reservas maternas preservadas, devido ao balanço energético menos negativo quando comparadas às ratas controle lactantes. Esta adaptação metabólica foi obtida, ao menos em parte, pela hipoinsulinemia, que resultou no aumento da sensibilidade à insulina favorecendo o aumento da deposição de gordura, hiperleptinemia e hipofagia.

Tabela 1. Composição das dietas normal 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

*Para composição detalhada, veja Reeves et al. (1993).

Tabela 2. Concentrações séricas de glicose (mg/dl), albumina (g/dl), proteína total (g/dl), insulina (ng/ml) e leptina (pg/ml) dos grupos não lactantes e lactantes de ratas mantidas com dieta controle (CNL and CL) ou hipoprotéica (HPNL and HPL)

	Grupos			
	CNL	CL	HPNL	HPL
Glicose	82±10 (8)	65±7,17 (8)	80±11 (8)	67±10 (7)
Albumina	3,37±0,16 (8)	2,62±0,15* (8)	3,34±0,38 (8)	2,39±0,14* (7)
Proteína total	6,20±0,57 (8)	5,57±0,40 (8)	5,92±0,40 (8)	4,78±0,49 (7)
Insulina	0,69±0,09 ^b (7)	1,38±0,12 ^a (7)	0,82±0,12 ^b (7)	0,49±0,09 ^b (7)
Leptina	4.530±700 ^b (7)	2.251±531 ^c (7)	5.620±368 ^{ab} (7)	7.208±604 ^a (7)

Valores expressos em média ± EPM do número de ratos entre parênteses. Médias com letras sobrescritas diferentes foram significativamente diferentes (Teste de Tukey HSD; $p \leq 0,05$).

* Diferença em relação às ratas não lactantes (ANOVA a dois fatores).

Tabela 3. Consumo alimentar absoluto (g) e relativo (g/100g), ingestão energética total (Kj), ingestão protéica total (g), dos grupos não lactantes e lactantes de ratas mantidas com dieta controle (CNL and CL) ou hipoprotéica (HPNL and HPL)

	Grupos			
	CNL	CL	HPNL	HPL
	(8)	(8)	(8)	(7)
Consumo alimentar absoluto	180±5,28 ^c	319±5,28 ^a	196±6,42 ^c	270±8,60 ^b
Consumo alimentar relativo	66±2,80 ^c	101±2,80 ^a	68±1,86 ^{bc}	79±3,85 ^b
Ingestão energética total	2,827±85 ^c	5,012±84 ^a	3,091±104 ^c	4,253±127 ^b
Ingestão protéica total	31±0,92 ^b	54±0,91 ^a	12±0,40 ^d	16±0,53 ^c

Valores expressos em média ± EPM do número de ratos entre parênteses. Médias com letras sobrescritas diferentes foram significativamente diferentes (Teste de Tukey HSD; $p \leq 0,05$).

Tabela 4. Composição da carcaça dos grupos não lactantes e lactantes de ratas mantidas com dieta controle (CNL and CL) ou hipoprotéica (HPNL and HPL)

	Grupos			
	CNL	CL	HPNL	HPL
	(8)	(8)	(8)	(7)
	g			
Peso corporal inicial	274±10	310±9,43*	283±5,28	319±10*
Peso corporal final	280±10	262±9,43*	292±4,53	272±11*
Carcaça fresca	204±6,80	187±6,42*	208±4,15	194±4,50*
Proteína	50±1,90	47±2,48*	51±1,99	46±1,93*
Lipídio	28±2,69	15±2,26*	35±1,95 §	29±2,18* §
Água	121±3,67	119±4,15	117±2,77	113±4,08
Cinza	5±0,57	6±0,32	5±0,61	6±0,38
	g/100g de peso da carcaça			
Proteína	25±0,55	25±0,65	24±0,70	24±0,55
Lipídio	13±0,93	8±1,12*	17±0,89 §	15±1,28* §
Água	59±0,73	64±0,83*	56±0,93 §	58±1,03* §
Cinza	3±0,28	3±0,22	3±0,27	3±0,19

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

* Diferença em relação às ratas não lactantes (ANOVA a dois fatores).

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

Tabela 5. Peso absoluto e relativo do tecido adiposo branco retroperitoneal, gonadal, e tecido adiposo marrom dos grupos não lactantes e lactantes de ratas mantidas com dieta controle (CNL and CL) ou hipoprotéica (HPNL and HPL)

	Grupos			
	CNL	CL	HPNL	HPL
	(8)	(8)	(8)	(7)
	g			
RET	4,83±0,37	3,57±0,61*	5,64±0,35 §	4,58±0,14* §
GON	10±0,69	6,77±0,97*	13±0,52 §	8,99±0,42* §
TAM	0,29±0,02	0,26±0,02	0,39±0,03 §	0,35±0,03 §
	g/100g			
RET	1,74±0,09	1,34±0,20*	1,95±0,11 §	1,70±0,10* §
GON	3,67±0,13	2,54±0,29*	4,53±0,12 §	3,32±0,17* §
TAM	0,11±0,01	0,10±0,01	0,14±0,01 §	0,12±0,01 §

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

* Diferença em relação às ratas não lactantes (ANOVA a dois fatores).

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

Tabela 6. Balanço energético dos grupos não lactantes e lactantes de ratas mantidas com dieta controle (CNL and CL) ou hipoprotéica (HPNL and HPL)

	Grupos			
	CNL	CL	HPNL	HPL
	(8)	(8)	(8)	(7)
	Kj			
Energia da carcaça	1.886±115	1.353±94*	2.190±75 §	1.866±62* §
Cálculo da linha de base	1.835±67	2.271±76	1.954±46	2.176±47
Balanço energético	51±45 ^a	-918±94 ^c	236±75 ^a	-310±62 ^b
Balanço lipídico	32±10 ^{ab}	-781±85 ^c	204±74 ^a	-155±82 ^b
Balanço protéico	19±9,01	-137±41*	32±13	-155±32*
Cálculo do gasto energético ¹	2.776±92 ^c	5.930±145 ^a	2.855±82 ^c	4.563±167 ^b
Eficiência energética ²	1,80±0,25	-18±1,79*	7,63±2,16 §	-7,29±1,38* §

Valores expressos em média ± EPM do número de ratos entre parênteses. Médias com letras sobrescritas diferentes foram significativamente diferentes (Teste de Tukey HSD; $p \leq 0,05$).

* Diferença em relação às ratas não lactantes (ANOVA a dois fatores).

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

¹ Gasto energético foi calculado pelo método do balanço (gasto energético= ingestão energética – balanço energético).

² Eficiência energética foi calculada da seguinte maneira (balanço energético/ingestão energética) x 100.

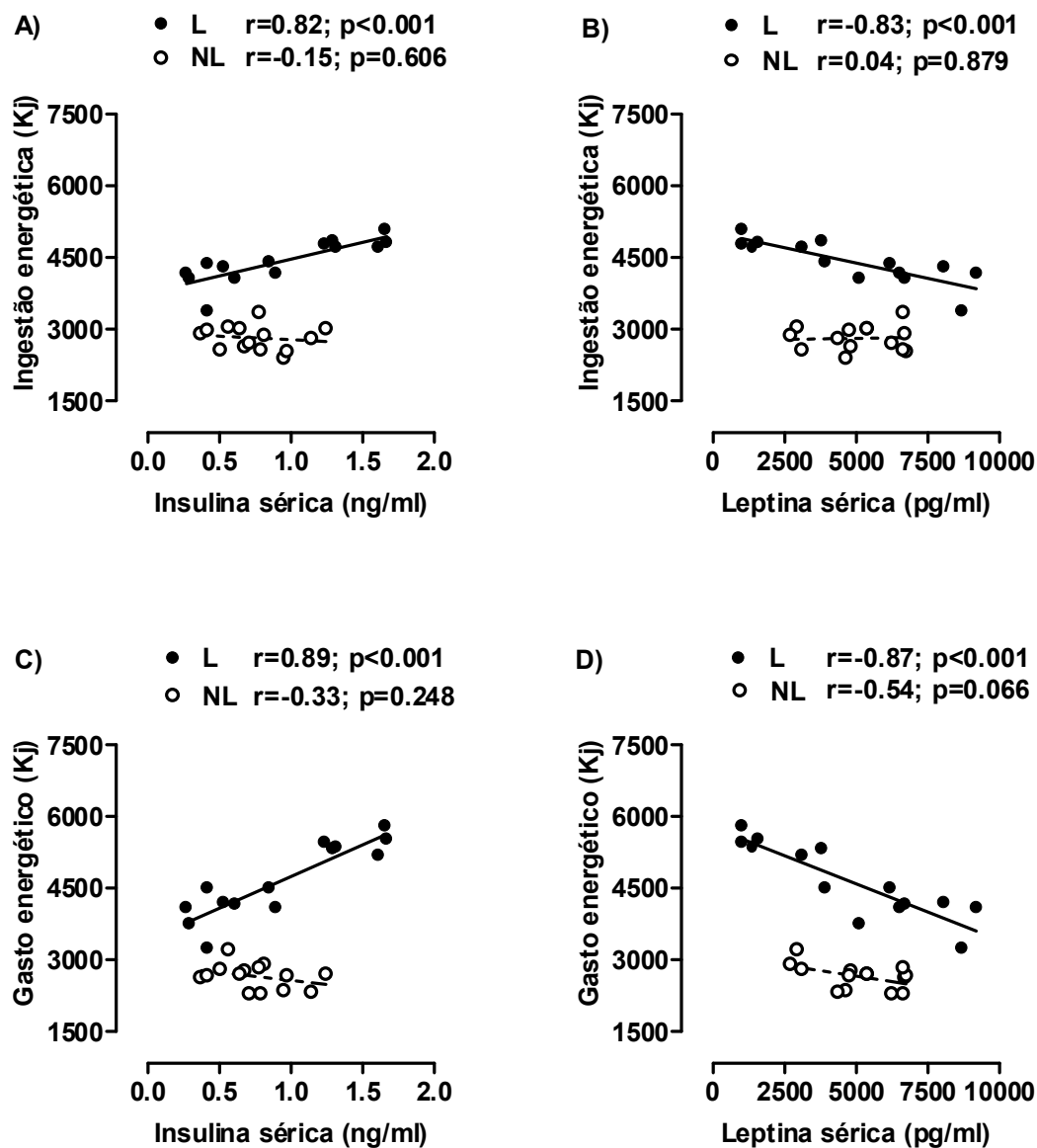


Figura 1. Correlação entre ingestão energética e níveis séricos de insulina (A), ingestão energética e níveis séricos de leptina (B), gasto energético e concentração sérica de insulina (C) e gasto energético e concentração sérica de leptina (D) de ratas lactantes (L) e não lactantes (NL).

Serum Leptin and Insulin Levels in Lactating Protein Restricted Rats: Implications for Energy Balance

Running head: Low protein diet and energy balance during lactation

Cristiane Lopes Pinto Ferreira¹, Gláucia da Silva Macêdo¹, Márcia Queiroz Latorraca¹, PhD, Vanessa Cristina Arantes¹, MSc, Roberto Vilela Veloso¹, MSc, Everardo Magalhães Carneiro², PhD, Antonio Carlos Boschero², PhD, Cláudia Maria Oller do Nascimento³, PhD, and Maria Helena Gaíva¹, PhD.

¹Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil. ²Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. ³Departamento de Fisiologia da Nutrição, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was partly supported by the Brazilian foundations FAPEMAT (grant n.175/04), CNPq (grant n. 479138/2003-6) and FINEP/PRONEX (grant n. 134/97). C.L.P. Ferreira was the recipient of a CAPES fellowship.

Mailing address: Maria Helena Gaíva Gomes da Silva, Departamento de Alimentos e Nutrição – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Avenida Fernando Correa da Costa, S/N, Coxipó - Cuiabá, MT, Brazil

Cep: 78060-900

Telephone: +55 65 615-8816 Fax: +55 65 615-8811

E-mail: marihele@cpd.ufmt.br

INTRODUCTION

In adult animals and humans, body weight tends to remain within a relatively narrow range, despite large day-to-day fluctuations in the amount of food consumed. Despite these observations we have noticed that obesity has increased worldwide. In the Brazilian adult population studies of the prevalence have shown an epidemic increase of obesity, mostly among women from lower social strata [1-4]. Although the improvement in economic conditions can partly explain such trends, it is possible that other factors are also important [5].

Low dietary protein is usually associated with hyperphagia [6,7], enhanced body fat content [6,8] and a number of adaptations such as enhances in basal metabolic rate [9], brown adipose tissue thermogenesis [10] and lipogenesis of white adipose tissue [11]. Dramatic feeding behavior and metabolic changes also seen in the lactation, as hyperphagia [12], decrease in basal metabolic rate [13], in brown adipose tissue thermogenesis [14] and in lipogenesis of white adipose tissue [15,16] assure the high energetic demand for the production of milk.

The feeding pattern and metabolic changes verified in the protein restriction and lactation correlates with equally profound alterations in the circulating levels of insulin and leptin [17,18], two hormones involved in the regulation of food intake and energy expenditure, and might promote obesity.

Thus, in the present study, we evaluated whether protein restriction affects the serum insulin and leptin levels and the role of these hormones on energy balance in the peak of lactation.

MATERIALS AND METHODS

1. Animals and diets

The experimental follows the COBEA guidelines (Brazilian College of Animal Experimentation) adopted by the Federal University Mato Grosso. Thirty one female Wistar rats (90 d old), were supplied by the animal central care facility of the Federal Mato Grosso University, Cuiabá – Brazil. Mating was performed by housing females with males overnight, and pregnancy was confirmed by the presence of sperm in vaginal smears. Virgin and pregnant females were separated at random and maintained from the first day of pregnancy until the 14th day of lactation with isocaloric diets containing 6% protein (low-protein diet) or 17% protein (control diet) as described in Table 1. Four groups of rats were used in this study: control non-lactating (CNL), control lactating (CL), low-protein non-lactating (LPNL), and low-protein lactating (LPL). Throughout the experimental period, the rats were given free access to food and water. They were kept under standard lighting conditions (12h light/dark cycle) at a temperature of 24 ± 1 °C.

The food intake and body weight were monitored three times a week. Spontaneous delivery took place on day 22 of pregnancy after which, at 3 d of age, large litters were reduced to eight pups, thus ensuring a standard litter size per mother.

2. Sample collection and analyses

At the end of the experimental period (day 14 of lactation), the rats were killed by decapitation. Blood samples were collected, serum was obtained by centrifugation and aliquots were used to measure serum glucose [19], total serum protein [20], serum albumin [21], serum insulin [22] and serum leptin (Kits Cristal Chem. Inc., Chicago, IL, USA)

concentrations. The white adipose tissue retroperitoneal (RET) and gonadal (GON) and brown adipose tissue (BAT) were quickly removed for determination of fresh weight.

3. Measurements of carcass composition and energy intake

Carcass was eviscerated, weighed and stored at -20°C for posterior composition analysis. Carcass water was measured by oven-drying at 80°C until constant weight. By subtracting dry carcass weight from wet carcass weight body water was determined. Fat carcass was measured by extraction in petroleum ether using a Soxhlet continuous fat extractor. Fat content was then calculated by subtracting fat-free dry mass from dry carcass weight. Ash content was estimated, following combustion at 550°C until constant weight. Protein content was determined by subtracting water, fat and ash content from wet carcass weight.

To calculate carcass energy and energy intake we assumed the energy content of protein and carbohydrate to be 16.74 KJ/g and fat to be 37.7 KJ/g . The carcass composition at the beginning of lactation (calculated baseline energy) was estimated by the relationship between carcass component of females under similar dietary treatments and the same physiological status at the end of pregnancy using the animal's body weight at day 1 of lactation.

From the difference between the final carcass composition and the calculated initial carcass composition, lipid balance, protein balance, energy balance, energy efficiency (the ratio of energy gain to energy balance) and energy expenditure (the difference between energy intake and energy balance) were calculated.

4. Statistical analyses

The results are expressed as the means $\pm$ SEM for the number of rats (n) indicated. Initially, Levene's test for the homogeneity of variance was used to check the fit of the data to the assumptions for parametric analysis of variance. When necessary a Box-Cox transformation

was used to correct the variance heterogeneity or non-normality [23]. All data were subsequently analyzed by two-way ANOVA (nutritional status and physiologic status) followed by the Tukey-HSD test for individual differences among groups, when necessary. Simple linear regression analysis was used to examine the relationship between serum leptin or insulin levels and several predictor variables of obesity. In all comparisons, statistical significance was accepted with $p \leq 0.05$. Statistical analysis was performed with the computer program, Statistic Software package (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTS

Biochemical and hormonal parameters

At day 14 of lactation, serum total protein and glucose concentration did not differ among the groups. In both nutritional statuses, lactating rats had lower albumin levels than non-lactating ($F_{1,27}=15.71$, $p<0.001$). Basal serum insulin was equal in LPL and LPNL groups and significantly higher in CL rats compared to LPL, LPNL and CNL ($p<0.01$). The serum leptin concentration did not differ between LPL and LPNL and was lower in CL group than in CNL, LPL and LPNL groups ($p<0.01$) (Table 2).

Body weight and food intake

Lactation significantly increased the total food intake and consequently the total energy and protein intakes in both nutritional statuses. However, these were lower in LPL rats than in CL rats ($p<0.001$). When expressed per gram of body weight, the food intake did not differ between LPL and LPNL rats but was greater in CL than CNL rats ($p<0.001$) (Table 3).

The relationship between energy intake and serum insulin concentrations, energy intake and leptin levels are shown in Figures 1A and 1B, respectively. In lactating rats, there was a significant positive correlation between serum insulin levels and energy intake ($r=0.82$, $p<0.001$) and negative relationship between serum leptin concentration and energy intake ($r=-0.83$, $p<0.001$). These correlations were absent in non-lactating for serum insulin ($r=-0.15$, $p=0.606$) and leptin levels ($r=0.04$, $p=0.879$). When data for non-lactating and lactating rats were pooled, energy intake was directly correlated with serum insulin concentration ($r=0.44$, $p<0.02$), but not with serum leptin concentration ($r=-0.32$, $p<0.09$).

Carcass composition and energy balance

Apart from the nutritional status, lactating rats had body weight higher at the beginning of the experimental period ($F_{1,27}=19.58$, $p<0.001$) and lower at day 14 lactation compared to non-lactating rats ($F_{1,27}=4.91$, $p<0.03$). Carcass fresh weight and carcass protein content were also lower in the lactating rats than in the non-lactating rats in both nutritional statuses ($F_{1,27}=8.79$, $p<0.006$ and $F_{1,27}=5.70$, $p<0.024$, respectively). The fat content of the carcass was significantly affected by lactation ($F_{1,27}=18.81$, $p<0.001$) and by dietary protein content ($F_{1,27}=24.39$, $p<0.001$), but there was no interaction between these factors ($F_{1,27}=1.97$, $p=0.172$). Thus, the carcass fat content of lactating rats was lower than non-lactating rats and higher in the protein deprived groups than in the control groups. The carcass water and ash contents did not differ among the groups. Also, no differences were observed among groups when the carcass protein and ash contents were expressed relative to body weight. The proportion of fat and water in the carcass was affected by the physiological ($F_{1,27}=13.06$, $p<0.001$ and $F_{1,27}=16.46$, $p<0.001$, respectively) and nutritional statuses ($F_{1,27}=27.41$, $p<0.001$ and $F_{1,27}=29.56$, $p<0.001$), but there was not interaction between these factors ($F_{1,27}=2.778$, $p=0.107$ and $F_{1,27}=2.024$, $p=0.166$), hence, lactating rats exhibited lower proportion of fat and higher proportion of water in the carcass than non-lactating rats. In contrast, protein deprived rats had higher percentage of fat and lower proportion of water in the carcass than control rats (Table 4).

The RET and GON fat pads weight were significantly affected by lactation ($F_{1,27}=8.90$, $p<0.005$ and $F_{1,27}=33.16$, $p<0.001$, respectively) and by protein deprivation ($F_{1,27}=4.90$, $p<0.03$ and $F_{1,27}=15.33$, $p<0.001$) in absolute values, but not by the two-way interaction nutritional status x physiological status ($F_{1,27}=0.003$, $p=0.953$ and $F_{1,27}=0.28$, $p=0.603$, respectively). Similar results were observed in relative values in the lactation ($F_{1,27}=6.24$, $p<0.019$ and $F_{1,27}=42.24$, $p<0.001$, respectively) and in the protein deprivation ($F_{1,27}=4.84$,

$p < 0.03$ and $F_{1,27} = 20.68$, $p < 0.001$, respectively) and in the two-way interaction of nutritional status x physiological status ($F_{1,27} = 0.30$, $p = 0.582$ and $F_{1,27} = 0.04$, $p = 0.831$, respectively). Thus, the fat pads weights of lactating rats were lower than non-lactating rats, and higher in the protein deprived groups than in the control groups. The BAT tissue weight was modified by only the nutritional status in absolute values ($F_{1,26} = 14.02$, $p < 0.001$) and in relative values ($F_{1,26} = 10.42$, $p < 0.001$). Protein deprived rats exhibited absolute BAT weight higher than control rats, independently of physiological status. This was confirmed when expressed as percentage of body weight (Table 5).

Serum leptin concentration was directly correlated with lipid carcass content ($r = 0.63$, $p < 0.001$) and weights of RET ($r = 0.55$, $p < 0.002$), GON ($r = 0.50$, $p < 0.007$) and BAT ($r = 0.43$, $p < 0.022$). In contrast, there was an inverse relationship between serum insulin levels and fat carcass content ($r = -0.62$, $p < 0.001$), RET ($r = -0.54$, $p < 0.001$) and weight of GON ($r = -0.56$, $p < 0.002$). The serum insulin levels were not correlated with weight of BAT ($r = -0.35$, $p = 0.070$).

LPL rats had energy intake lower but carcass energy higher than CL rats. The energy balance was influenced by nutritional status ($F_{1,27} = 30.86$, $p < 0.001$), lactation ($F_{1,27} = 113.04$, $p < 0.001$), as well as by the interaction between both factors ($F_{1,27} = 8.82$, $p < 0.006$). Thus, there was a negative energy balance in lactating rats, but less severe in the LPL than in the CL group. The energy balance correlated negatively with energy intake in lactating rats ($r = -0.81$, $p < 0.001$) and when data from both groups were combined ($r = -0.87$, $p < 0.001$). This correlation was weaker only in non-lactating rats ($r = 0.44$, $p = 0.117$).

A considerable carcass energy loss as lipid in LPL and CL groups was observed, however less severe in the first group than in the latter one ($p < 0.001$). Independently of nutritional status, lactating rats showed a reduction of carcass energy as protein in relation to the non-lactating rats ($F_{1,27} = 28.13$, $p < 0.001$).

Energy expenditure, calculated by the energy balance method, was significantly affected by the nutritional ($F_{1,27}=31.08$, $p<0.001$) physiological statuses ($F_{1,27}=443.13$, $p<0.001$) as well as by the interaction between these factors ($F_{1,27}=39.16$, $p<0.001$). Thus, energy expenditure was significantly higher in the lactating rats, but lower in the LPL than in the CL group ($p<0.001$). Energy efficiency was significantly modified by lactation ($F_{1,27}=90.01$, $p<0.001$) and by nutritional status ($F_{1,27}=20.78$, $p<0.001$), but no effect of the interaction of these factors was verified ($F_{1,27}=2.15$, $p=0.154$). Hence, energy efficiency was reduced by lactation and increased by protein deprivation (Table 6).

The relationship between energy expenditure and serum insulin levels was positive ($r=0.89$, $p<0.001$), and negative between energy expenditure and serum leptin levels ($r=-0.87$, $p<0.001$) in lactating rats. These correlations were weaker in non-lactating rats (Figures 1C and D). When data from non-lactating and lactating rats were pooled, the energy expenditure correlated directly with serum insulin concentration ($r=0.53$, $p<0.004$) and inversely with serum leptin concentration ($r=-0.46$, $p<0.012$).

DISCUSSION

Rats fed with low protein diet did not exhibit features typical of protein malnutrition such as low body weight and hypoalbuminemia. However, the “adiposity signals” (serum insulin and serum leptin concentrations) was different in response to dietary protein content. In LPL and LPNL rats the insulinaemia was similar, whereas in CL rats the serum insulin concentration was greater than in CNL rats.

Also, serum leptin concentration was not different between LPL and LPNL rats, and in CL rats the leptinaemia was reduced by 50% compared with CNL rats. In consequence, the serum leptin concentration was higher in HPL rats than in CL rats. Although some found no change in the serum leptin in lactating rats [24,25], several studies show that there is a 20-75% decrease in serum leptin in the daytime during lactation [26-28]. There are several possible explanations for the increase in serum leptin concentrations verified in lactating rats submitted to protein restriction. One explanation is concerned with the low rates of milk production in these rats [29], since that lactating rats treated with a pharmacological agent that suppresses the prolactin secretion and the milk production (bromocriptine) [12,30] show high serum leptin concentration [12]. The second explanation is the decreased clearance rate of leptin due to a reduced cardiac output and reduced blood flow and/or reduced milk yield [31]. This supposition is reinforced by the fact that the clearance rate of leptin is increased in normal lactating rats which is compatible with the high cardiac output during lactation [32] and that leptin is also secreted into milk [33]. Finally, the increased synthesis of hormone by white adipose tissue since leptin is synthesized predominantly by this tissue, proportionally to the body fat stores [34,35]. In our study, rats fed a low protein diet had a significant increase in retroperitoneal and gonadal fat pads as well as higher carcass fat content. Moreover, the serum leptin concentrations directly correlated with carcass fat, gonadal and retroperitoneal

adipose tissue weight, explaining the increase in the synthesis of leptin in malnourished rats. The higher adiposity of rats submitted to protein restriction may be the consequence of higher sensibility of adipocytes to insulin with consequent increase in the synthesis of lipids and inhibition of their degradation. This assumption agrees with previous observations showing that hypoinsulinaemia was associated with an increase in insulin sensitivity in adipose tissue of malnourished rats [36,37]. In accordance, our results showed an inverse correlation between insulinaemia and fat carcass content, RET and GON weights. High sensitivity of adipocytes to insulin could also contribute to increase leptin secretion and biosynthesis. Studies *in vitro* showed that insulin acts directly at the level of adipocytes increasing leptin mRNA levels and secretion [38,39], perhaps due to increased glucose transport and metabolism [40]. On the other hand, the enhanced peripheral sensitivity to insulin may be a consequence of higher leptin levels, since the administration of leptin either centrally or peripherally increased insulin-stimulated glucose use by peripheral tissues in normal rats [41,42]. Finally, the negative energy balance showed by our lactating rats maintained with low protein diet could be involved. The negative energy balance appears to be the major factor responsible for the hypoleptinaemia of lactation [43]. Confirming this supposition, we observed that leptinaemia was directly related to energy balance only in lactating rats. Moreover, HPL rats that showed higher levels of this hormone, had also energy balance minus negative.

Hypoleptinaemia during lactation may drive or, at least, facilitates hyperphagia [43]. In this study, LPL rats, that had higher serum leptin and lower serum insulin levels consume less amount of food (in absolute value and when expressed per gram of body weight) than the CL rats with lower serum leptin and higher serum insulin levels. In lactating rats there was a significant negative correlation between serum leptin and energy intake, but this correlation was absent either in non-lactating rats or when data for non-lactating and lactating rats were

pooled. The relationship between intake energy and serum insulin was not significant in non-lactating rats alone, however there was a positive correlation in lactating rats and in the combining data from both groups. Furthermore, the energy intake was negatively related with energy balance in lactating rats. These findings suggest that: 1) in the normal lactation occurs peripheral insulin resistance [44] that contributes to negative energy balance leading to hypoleptinaemia that together with hypothalamic insulin resistance results in hyperphagia. 2) protein restriction during lactation reduces serum insulin levels favoring the enhances of peripheral sensitivity to hormone that contributes to greater maternal fat deposition and hyperleptinaemia. The high serum leptin levels associated to an increase in the hypothalamic sensitivity to insulin decreased the food intake.

Studies have showed that the high energetic cost of lactation is supplied by the increase food intake associated to using the stored fat [45], and to conserving metabolic fuels due to reduction in brown fat thermogenesis [46]. In the reduction of dietary protein level, although occurs hyperphagia, it is accompanied by a decrease in food efficiency and an increase in energy expenditure in an apparent attempt to dissipate excess energy [47]. These changes in metabolic efficiencies appear to be the result of adaptive diet-induced thermogenesis associated with increased activity of brown adipose tissue [10]. In this study, LPL rats had decreased energy expenditure and lower depletion in the reserves of fat carcass compared to CL rats. Curiously, the groups maintained with low protein diet exhibited better energy efficiency, possibly due to hypophagia that resulted in a decrease of energy expenditure in an attempt to conserve energy. This change in metabolic efficiency did not appear to be resulted of adaptative diet-induced thermogenesis, to judge for the higher brown adipose tissue weight in rats maintained with low protein diet, an indication of greater metabolic activity in this tissue [10]. Neither seen to result from decrease basal metabolic rate, since that this change is related, among others factors, to low thyroid hormone concentration. In our case,

hypothyroidism could, since that, at least in the lactation, this alteration is associated to hypoleptinaemia [48].

Beyond hypophagia, hypoinsulinaemia is another candidate to explain the reduced energy expenditure, since that was directly correlated with serum insulin, and negatively correlated with serum leptin. Low serum insulin concentration could to determinate increased insulin sensitivity in adipocytes raising the lipogenesis in the white adipose tissue.

Thus, rats submitted to protein restriction during pregnancy and lactation showed at peak of lactation, maternal reserves preserved due to energy balance minus negative when compared to lactating control rats. This metabolic adaptation was obtained, at least in part, by the hypoinsulinaemia that resulted in increased insulin sensitivity favoring enhances fat deposition, hyperleptinaemia and hypophagia.

Table 1. Composition of the normal and low-protein diets*

Ingredient	Control diet	Low-protein diet
	(17% protein)	(6% protein)
	g/kg	
Casein (84% protein)	202.0	71.5
Cornstarch	397.0	480.0
Dextrinized cornstarch	130.5	159.0
Sucrose	100.0	121.0
Soybean oil	70.0	70.0
Fiber	50.0	50.0
Mineral mix (AIN-93G)*	35.0	35.0
Vitamin mix (AIN-93G)*	10.0	10.0
L-cystine	3.0	1.0
Cholibe bitartrate	2.5	2.5

*For detailed composition, see Reeves et al. (1993).

Table 2. Serum concentration of glucose (mg/dl), albumin (g/dl), total protein (g/dl), insulin (ng/ml) and leptin (pg/ml) of non-lactating and lactating groups of rats maintained with control (CNL and CL) or low-protein (LPNL) and (LPL) diets

	Groups			
	CNL	CL	LPNL	LPL
Glucose	82±10 (8)	65±7.17 (8)	80±11 (8)	67±10 (7)
Albumin	3.37±0.16 (8)	2.62±0.15* (8)	3.34±0.38 (8)	2.39±0.14* (7)
Total protein	6.20±0.57 (8)	5.57±0.40 (8)	5.92±0.40 (8)	4.78±0.49 (7)
Insulin	0.69±0.09 ^b (7)	1.38±0.12 ^a (7)	0.82±0.12 ^b (7)	0.49±0.09 ^b (7)
Leptin	4,530±700 ^b (7)	2,251±531 ^c (7)	5,620±368 ^{ab} (7)	7,208±604 ^a (7)

Values are means ± SEM of numbers of rats in parentheses. Means with a different superscript letters were significantly different (Tukey HSD test; $p \leq 0.05$).

* Different in relation to non-lactating rats (two-way ANOVA).

Table 3. Absolute (g) and relative (g/100g) food intake, total energy food intake (Kj), total protein intake (g), of non-lactating and lactating groups of rats maintained with control (CNL and CL) or low-protein (LPNL and LPL) diets

	Groups			
	CNL	CL	LPNL	LPL
	(8)	(8)	(8)	(7)
Absolute food intake	180±5.28 ^c	319±5.28 ^a	196±6.42 ^c	270±8.60 ^b
Relative food intake	66±2.80 ^c	101±2.80 ^a	68±1.86 ^{bc}	79±3.85 ^b
Total energy intake	2,827±85 ^c	5,012±84 ^a	3,091±104 ^c	4,253±127 ^b
Total protein intake	31±0.92 ^b	54±0.91 ^a	12±0.40 ^d	16±0.53 ^c

Values are means ± SEM of numbers of rats in parentheses. Means with a different superscript letters were significantly different (Tukey HSD test; $p \leq 0.05$).

Table 4. Carcass composition of non-lactating and lactating groups of rats maintained with control (CNL and CL) or low-protein (LPNL and LPL) diets

	Groups			
	CNL	CL	LPNL	LPL
	(8)	(8)	(8)	(7)
G				
Initial body weight	274±10	310±9.43*	283±5.28	319±10*
Final body weight	280±10	262±9.43*	292±4.53	272±11*
Fresh carcass weight	204±6.80	187±6.42*	208±4.15	194±4.50*
Protein	50±1.90	47±2.48*	51±1.99	46±1.93*
Lipid	28±2.69	15±2.26*	35±1.95 §	29±2.18* §
Water	121±3.67	119±4.15	117±2.77	113±4.08
Ash	5±0.57	6±0.32	5±0.61	6±0.38
g/100g of carcass weight				
Protein	25±0.55	25±0.65	24±0.70	24±0.55
Lipid	13±0.93	8±1.12*	17±0.89 §	15±1.28* §
Water	59±0.73	64±0.83*	56±0.93 §	58±1.03* §
Ash	3±0.28	3±0.22	3±0.27	3±0.19

Values are means ± SEM of numbers of rats in parentheses.

* Different in relation to non-lactating rats (two-way ANOVA).

§ Different in relation to rats fed with control diet (two-way ANOVA).

Table 5. Absolute and relative weight of white adipose tissue retroperitoneal, gonadal, and brown adipose tissue of non-lactating and lactating groups of rats maintained with control (CNL and CL) or low-protein (LPNL and LPL) diets

	Groups			
	CNL	CL	LPNL	LPL
	(8)	(8)	(8)	(7)
G				
RET	4.83±0.37	3.57±0.61*	5.64±0.35 [§]	4.58±0.14* [§]
GON	10±0.69	6.77±0.97*	13±0.52 [§]	8.99±0.42* [§]
BAT	0.29±0.02	0.26±0.02	0.39±0.03 [§]	0.35±0.03 [§]
g/100g				
RET	1.74±0.09	1.34±0.20*	1.95±0.11 [§]	1.70±0.10* [§]
GON	3.67±0.13	2.54±0.29*	4.53±0.12 [§]	3.32±0.17* [§]
BAT	0.11±0.01	0.10±0.01	0.14±0.01 [§]	0.12±0.01 [§]

Values are means ± SEM of numbers of rats in parentheses.

*Different in relation to non-lactating rats (two-way ANOVA).

[§]Different in relation to rats fed with control diet (two-way ANOVA).

Table 6. Energy balance of non-lactating and lactating groups of rats maintained with control (CNL and CL) or low-protein (LPNL and LPL) diets

	Groups			
	CNL	CL	LPNL	LPL
	(8)	(8)	(8)	(7)
	Kj			
Carcass energy	1,886±115	1,353±94*	2,190±75 §	1,866±62* §
Calculated baseline energy	1,835±67	2,271±76	1,954±46	2,176±47
Energy balance	51±45 ^a	-918±94 ^c	236±75 ^a	-310±62 ^b
Lipid balance	32±10 ^{ab}	-781±85 ^c	204±74 ^a	-155±82 ^b
Protein balance	19±9.01	-137±41*	32±13	-155±32*
Calculated energy expenditure ¹	2,776±92 ^c	5,930±145 ^a	2,855±82 ^c	4,563±167 ^b
Energy efficiency ²	1.80±0.25	-18±1.79*	7.63±2.16 §	-7.29±1.38* §

Values are means ± SEM of numbers of rats in parentheses. Means with a different superscript letters were significantly different (Tukey HSD test; $p \leq 0.05$).

*Different in relation to non-lactating rats (two-way ANOVA).

§Different in relation to rats fed with control diet (two-way ANOVA).

¹ Energy expenditure was calculated by the balance method (energy expenditure = energy intake – energy balance).

² Energy efficiency was calculated as the (energy balance/energy intake) x 100.

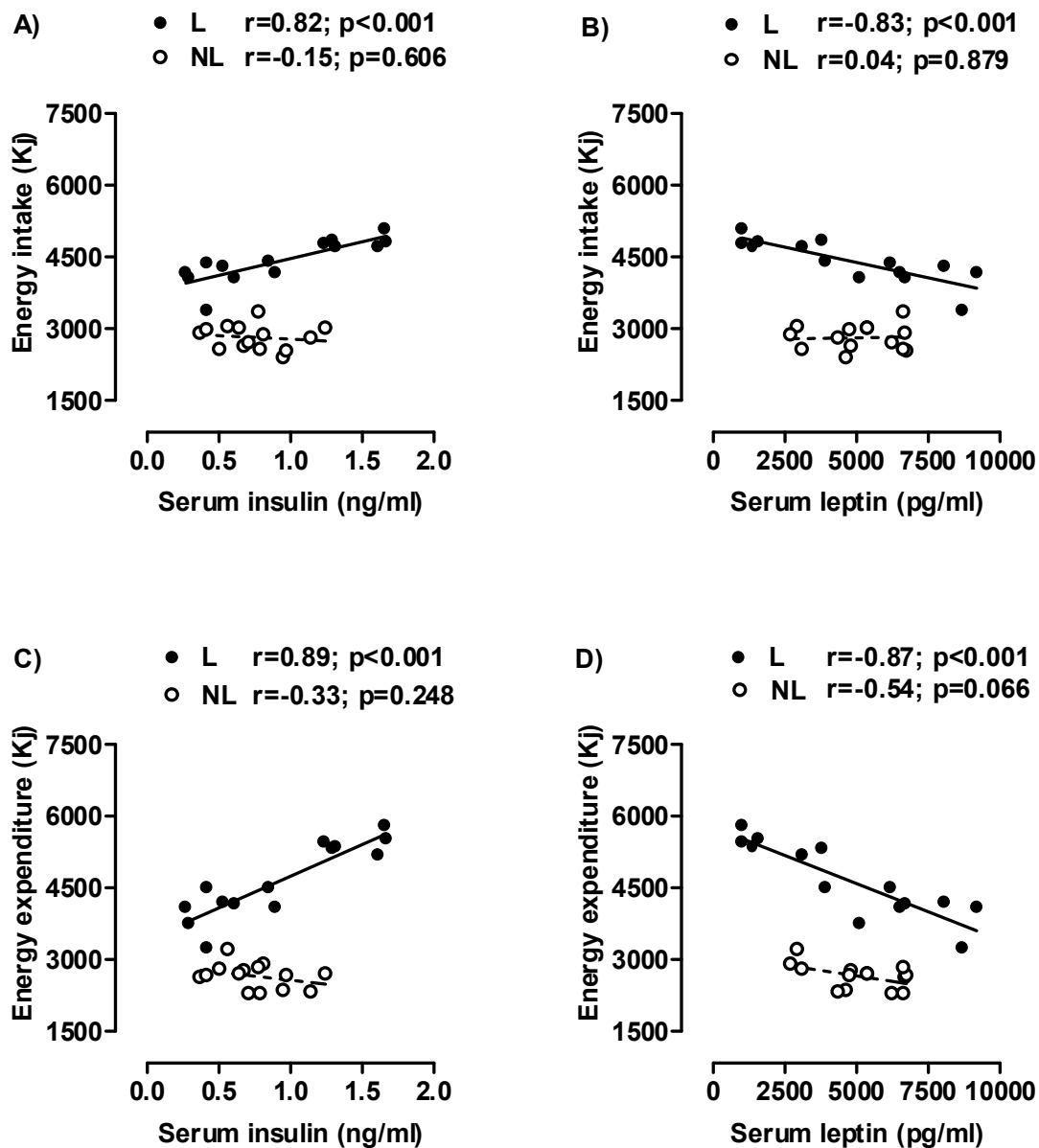


Figure 1. Correlation between energy intake and serum insulin levels (A), energy intake and serum leptin levels (B), energy expenditure and serum insulin concentration (C) and energy expenditure and serum leptin concentration (D) of lactating (L) and non-lactating (NL) rats.

REFERENCES:

- [1] 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.

- [2] 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.

- [3] Florêncio TT. Obesity in adult population residing in a “sem teto”- homeless encampment in the northeast of Brazil. *International Journal of Obesity* 1998; 22: 245S.

- [4] Monteiro CA, Mondini L. The changing nature of nutrition disorders in the developing countries: the case of Brazil. *Proceedings of the 16th International Congress of Nutrition*, Montreal: Canadian Federation of Biological Sciences 1997; 263.

- [5] Popkin BM & Bisgrove ES. Urbanization and nutrition in low-income countries. *Food Nutrition Bulletin* 1988; 10: 3-23.

- [6] White BD, Dean RG, Martin RJ. Na association between low levels of dietary protein, elevated NPY gene expression in the basomedial hypothalamus and increased food intake. *Nutr Neurosci* 1998; 1: 173-182.

- [7] Colombo JP, Cervantes H, Kokorovic M, Pfister U, Perritaz R. Effects of dietary protein on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in the rats. *Ann Nutr & Metabol* 1992; 36: 23-33.

- [8] Du F, Higginbotham DA, White BD. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr* 2000; 130: 514-521.

- [9] Tulp OL, Krupp PP, Danforth E, Horton ES. Characteristics of thyroid function in experimental protein malnutrition. *J Nutr* 1979; 109: 1321-1332.
- [10] 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.
- [11] Heard CRC, Turner MR. Glucose tolerance and related factors in dogs fed diets of suboptimal protein value. *Diabetes* 1967; 16: 96-107.
- [12] Denis RGP, Williams G, Vernon RG. Regulation of serum leptin and its role in the hyperphagia of lactation in the rat. *J Endocrinology* 2003; 176: 193-203.
- [13] Shetty PS. Physiological mechanisms in the adaptive response of metabolic rates to energy restriction. *Nutr Res Rev* 1990; 3: 49-74.
- [14] Trayhurn P. Thermogenesis and the energetics of pregnancy and lactation. *Can J Physiol Pharm* 1989; 67: 370-375.
- [15] McNamara J. P. Role and regulation of metabolism in adipose tissue during lactation. *Nutr Biochem* 1995; 6: 120-129.
- [16] Vernon R. G.; Pond C. M. Adaptations of maternal adipose tissue to lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997; 2: 231-241.
- [17] Vernon RG. Endocrine control of metabolic adaptation during lactation. *Proc Nutr Soc* 1989; 48: 23-32.
- [18] Terada Y, Yamakawa K, Sugaya A, Toyoda N. Serum leptin levels do not rise during pregnancy in age-matched rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 841-844.

- [19] Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Path* 1969; 22: 158-161.
- [20] Wolfson WQ, Chon 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 1.0ml of serum. *Am J Clin Path* 1948; 18: 723-730.
- [21] Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and measurements of serum albumin with bronocresol green. *Clin Chim Acta* 1971; 31: 87-96.
- [22] Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for the simultaneous measurement of insulin released and B-cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* 1981; 21: 470-475.
- [23] Sokal RR, Rohlf FJ. Assumptions of analysis of variance. In: Biometry: The principles and practice of statistics in biological research, ed. *W. H. Freeman and Company*. New York, 1995;392-450.
- [24] Chien EK, Hara M, Rouard M, et al. Increase in serum leptin and uterine leptin receptor messenger RNA levels during pregnancy in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 476-480.
- [25] Carmen-Garcia MD, Casanueva FF, Dieguez C, Senaris RM. Gestational profile of leptin messenger ribonucleic acid (mRNA) content in the placenta and adipose tissue in the rat, and regulation of the mRNA levels of the leptin receptor subtypes in the hypothalamus during pregnancy and lactation. *Biol Reprod* 2000; 62: 698-703.
- [26] Woodside B, Abizaid A, Walker C-D. Changes in leptin levels during lactation: implications for lactational hyperphagia and anovulation. *Horm Behav* 2000; 37: 353-365.
- [27] Brogan RS, Mitchell SE, Trayhurn P, Smith MS. Suppression of leptin during lactation: contribution of the suckling stimulus versus milk production. *Endocrinology* 1999; 140: 2621-2627.

- [28] Herrera E, Lasunción MA, Huerta L, Martín-Hidalgo A. Plasma leptin levels in rat mother and offspring during pregnancy and lactation. *Biol Neonate* 2000; 78: 315-320.
- [29] Grigor MR, Allan JE, Carrington JM, et al. Effect of dietary protein and food restriction on milk production and composition, maternal tissues and enzymes in lactating rats. *J Nutr* 1987; 117: 1247-1258.
- [30] Cowie AT, Forsyth IA, Hart IC. Hormonal control of lactation. *Monogr Endocrinol* 1980; 15: 165-168.
- [31] Sakanashi TM, Brigham HE, Rasmussen KM. Effect of dietary restriction during lactation on cardiac output, organ blood flow and organ weights of rats. *J Nutr* 1987; 117: 1469-1474.
- [32] Williamson DH. Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Letts* 1980; 117: K93-K105.
- [33] Bonnet M, Delavaud C, Laud K, Gourdou I, Leroux C, Djiane J, Chilliard Y. Mammary leptin synthesis, milk leptin and their putative physiological roles. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42: 1-15.
- [34] Harvey J & Ashford MLJ. Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology* 2003; 44: 845-854.
- [35] Frühbeck G. A heliocentric view of leptin. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 301-318.
- [36] Shepherd PR, Crowther NJ, Desai M, Hales CN, Ozanne SE. Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br J Nutr* 1997; 78: 121-129.
- [37] Ozanne SE, Dorling MW, Wang CL, Petry CJ. Depot-specific effects of early growth retardation on adipocyte insulin action. *Horm Metab Res* 2000; 32: 71-75.
- [38] Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 1997; 138: 4463-4472.

- [39] Hardie LJ, Guilhot N, Trayhurn P. Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm Metab Res* 1996; 28: 685-689.
- [40] Müller WM, Gregoire FM, Stanhope KL, et al. Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology* 1998; 139: 551-558.
- [41] Barzilai N, Wang J, Massilon D, et al. Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest* 1997; 100: 3105-3110.
- [42] Lin CY, Higginbotham DA, Judd RL, White BD. Central leptin increases insulin sensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E1084-E1091.
- [43] Vernon RG, Denis RGP, Sorensen A, Williams G. Leptin and the adaptations of lactation in rodents and ruminants. *Horm Metab Res* 2002; 34: 678-685.
- [44] Vernon RG, Faulkner A, Hay WWJ, Calvert DT, Flint DJ. Insulin resistance of hind-limb tissues in vivo in lactating sheep. *Biochem J* 1990; 290: 783-786.
- [45] Naismith DJ, Richardson DP, Pritchard AE. The utilization of protein and energy during lactation in the rat, with particular regard to the utilization of fat accumulated during pregnancy. *Br J Nutr* 1982; 48: 433-441.
- [46] Trayhurn P & Richard D. Brown adipose tissue thermogenesis and the energetics of pregnancy and lactation in rodents. *Biochem Soc Trans* 1985; 13: 826-828.
- [47] Specter SE, Hamilton JS, Stern JS, Howitz BA. Chronic protein restriction does not alter energetic efficiency of brown adipose tissue thermogenic capacity in genetically obese (fa/fa) Zucker rats. *J Nutr* 1995; 125: 2183-2193.

- [48] Ahima RS. Leptin and the neuroendocrinology of fasting. *Frontiers in Hormonal Research* 2000; 26: 42-56.

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](#)