

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Atividade da via do mTOR no músculo esquelético da prole
é afetada pelo consumo materno de dieta hiperlipídica e
difere entre os animais neonatos e lactentes

Lucas Carminatti Pantaleão

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Lucas Carminatti Pantaleão

Atividade da via do mTOR no músculo esquelético da prole é afetada pelo consumo materno de dieta hiperlipídica e difere entre os animais neonatos e lactentes

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do título de mestre

Prof. Dr. Julio Orlando Trapegui Toledo
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

***“Não importa o que você faça em sua vida,
será insignificante. Porém, é muito
importante que você o faça”***

Mahatma Gandhi

DEDICATÓRIA

*dedico este trabalho à Maria Marciana Carminatti Pantaleão que,
D muito mais do que uma simples mãe, é meu herói e meu exemplo,
sem a qual esta obra jamais chegaria a ser escrita. Por fazer do sucesso de
seus filhos um projeto pessoal, por cada palavra de ânimo quando o
cansaço nos tenta derrubar e por nunca ter desistido de mim, lhe sou
muitíssimo grato.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, que encheu meu coração de fôlego e que me deu a graça de compartilhar meus momentos com pessoas virtuosas e especiais.

Aos meus irmãos **Denis** e **Caio**, pelo carinho e companheirismo. Por acreditarem que nenhum passo dado nessa empreitada tenha sido dado em vão. Não consigo imaginar nem mesmo um segundo da minha vida sem vocês.

Ao meu pai, **José Rodrigues Pantaleão**, que me aceitou em sua vida e que ajudou na construção da história dessa família.

À minha namorada **Renata**, que esteve ao meu lado quando mais precisei. Por sua dedicação, seu carinho e seu amor incondicional – Por ajudar a construir a **nossa** história nos últimos quatro anos.

Ao meu orientador e amigo **Julio Tirapegui**, pela oportunidade e pelos ensinamentos diários. Sua enorme cultura nos instiga a curiosidade e o compromisso com a ciência.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Bioquímica da Nutrição. Os saúdo pela nossa amizade e cumplicidade. Abaixo, faço menção individual, uma vez que vocês são tão donos deste trabalho quanto eu.

Ao meu amigo **Leonardo Torres Leal**, por me mostrar a beleza da ciência, com sua dedicação e compromisso. Por cada dia, noite e madrugada de trabalho árduo. Por resgatarmos ratos nadadores do afogamento iminente e pelas lágrimas de alegria quando aquelas bandas acenderam.

À minha amiga **Gabriela Fullin Teodoro Rezende**, por sua simplicidade de coração, por não me abandonar nos dias de maior trabalho no biotério e por me ajudar a dissecar tecidos tão pequenos que outras pessoas nem acreditavam que realmente existiam.

À **Daiana Viana**, pelos ensinamentos no início de meus estudos e por sempre estar próxima de seus amigos nos períodos mais difíceis da pós-graduação. Se não fosse por você, ainda estaria fazendo cálculos e grampeando notas fiscais.

À minha irmãzinha **Tatyana Dias de Paula**, por sua amizade e parceria nesses últimos anos. Por tolerar meus momentos de fraqueza e por me apoiar naqueles de angústia.

Ao meu amigo **Emídio Matos**, por ser essa pessoa solícita e especial, que luta pelos seus amigos e jamais os abandona.

À minha amiga **Michele Trindade**, por tornar nossos dias difíceis um pouco mais agradáveis.

Aos meus amigos **Vinícius Cruzat** e **Mariana Lindemberg** que sempre me apoiaram e torceram pelo sucesso deste trabalho

À minha amiga **Ivanir Pires**, que foi fundamental para o meu aprendizado e que sempre esteve disposta a contribuir de todas as formas.

Às alunas de iniciação científica **Nívea** e **Lara**, pela colaboração em nossos projetos e pela amizade.

Aos demais membros deste laboratório – **Éder, Luciana Rossi, Jonas, Mariana Rezende, Mariana de Capitani, João, Luciana Nishimura e Andréia** – com os quais tive menor contato neste período, mas pelos quais tenho grande estima e admiração.

Ao professor **Marcelo Macedo Rogero**, pela eterna disposição em contribuir para o desenvolvimento deste trabalho e das nossas faculdades intelectuais.

Às alunas de pós-graduação da Faculdade de Saúde Pública – **Carolina, Tatiane, Mônica e Patrícia** – pela companhia e amizade.

Ao **Carlos Roberto Bueno Júnior**, por ter sido um verdadeiro professor e amigo durante este período.

A todos os membros do laboratório de hematologia – **Mariana, Amanda, Karina, Grazi, Luciana, professor Ricardo Fock e professora Primavera Borelli** – pela amizade, auxílio e contribuição.

Aos membros da minha banca de qualificação – **Dennys Cintra, Silvana Bordini e Thomas Prates Ong** – pela enorme contribuição e disponibilidade.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – **Lurdinha, Joana, Edílson, Mônica, Cleo, Jorge e Elaine** – por sua amizade e pelas inúmeras vezes que necessitei da ajuda dos mesmos e fui prontamente atendido.

A todos os membros da minha família materna e paterna, pelo apoio e pela torcida. Aos meus tios **José, Sérgio, Neno e Inês**, eu gostaria de fazer um agradecimento especial, pelo respeito, atenção e carinho dedicados à minha família ao longo desses anos de dificuldades e tribulações.

A todos os meus **amigos de São Paulo e de Itu**, que mesmo sem entender a essência do meu trabalho, acreditaram que ele era de grande importância.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP** e a todas as entidades que a compõem.

À **FAPESP** e à **CAPES**, pelo auxílio pesquisa e pela bolsa de estudos concedidos.

Às demais pessoas e instituições que fizeram parte da minha vida e contribuíram para a realização deste trabalho e que, porventura, eu não tenha mencionado nestas palavras.

RESUMO

PANTALEÃO, L.C. **Atividade da via do mTOR no músculo esquelético da prole é afetada pelo consumo materno de dieta hiperlipídica e difere entre os animais neonatos e lactentes.** 2010. 124p. [Dissertação (Mestrado – Departamento de Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2010].

A redução no desenvolvimento muscular de filhotes cujas mães foram submetidas ao consumo de dietas baseadas no padrão ocidental pode ser, ao menos em parte, explicada pela resistência periférica à insulina, condição na qual a atividade de proteínas relacionadas à via de sinalização intracelular sensível a esse hormônio encontra-se reduzida. A regulação positiva dessa via resulta no aumento da atividade do Alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR) que atua como efetor positivo da taxa de tradução de RNAm e, conseqüentemente, da síntese proteica. Estudos que avaliam a atividade dessa proteína frente ao consumo crônico de dietas hiperlipídicas são escassos e controversos e, até o momento, não são conhecidos trabalhos que avaliam esses marcadores em animais neonatos ou desmamados, provenientes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica gestacional e pós-gestacional. O presente estudo objetiva avaliar o efeito do consumo de uma dieta hiperlipídica por ratas adultas sobre a morfologia e sobre a expressão e a fosforilação das proteínas que compõem a via de sinalização intracelular do mTOR no músculo esquelético da prole em dois momentos: nascimento e desmame. Para isso, inicialmente, 39 ratas foram distribuídas em dois grupos, de acordo com a dieta oferecida: controle (n=19) e hiperlipídica (n=20). Após o nascimento, cerca de seis filhotes por mãe foram eutanasiados para coleta de amostras e análise dos marcadores investigados. Os filhotes selecionados para dar continuidade ao experimento foram dispostos junto às mães que, por sua vez, foram distribuídas em outros quatro grupos, segundo a dieta gestacional e pós-gestacional: CON/CON (n=8); CON/HL (n=9); HL/HL (n=8); HL/CON (n=7). Ao final da lactação, os filhotes foram eutanasiados e amostras foram coletadas para análise. Os resultados obtidos indicam que, em relação aos animais neonatos, há redução das concentrações séricas de leptina e de IGF-I e aumento da fosforilação da Akt e do mTOR musculares, em resposta ao consumo materno da dieta hiperlipídica. Por sua vez, nos animais lactentes, observamos influência da dieta hiperlipídica materna pós-gestacional sobre a promoção de fenótipo obesogênico, com concomitante redução do desenvolvimento muscular e da fosforilação de proteínas alvo do mTOR em estado pós-prandial. Com base nos resultados obtidos, concluímos que a dieta hiperlipídica materna afeta a atividade do mTOR, sendo, esse efeito, dependente da idade e da condição fisiológica dos animais.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica. Gestação. Lacta o. MTOR. Prole. Desenvolvimento muscular

ABSTRACT

PANTALEÃO, L.C. **MTOR pathway activity in skeletal muscle of offspring is affected by maternal consumption of high fat diet differently between newborns and infants.** 2010. 124p. [Dissertation (Master degree – Food Science Department) – Pharmaceutical Science School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 2010].

The decrease in muscle development of offspring whose mothers consume a typical Western diet can be partly explained by the progression of peripheral insulin resistance, a condition in which the activity of proteins related to the intracellular signaling pathway sensitive to this hormone is reduced. The positive regulation of this pathway results in increased activity of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) that acts as a positive regulator of the rate of mRNA translation and protein synthesis. Studies that assess the activity of this protein in response to chronic consumption of high fat diets are scarce and controversial and, to date, studies that evaluated these markers in the offspring of mothers fed a high fat diet during gestational and lactation are not known. This study aims to evaluate the effect of consuming a high fat diet for female adult rats in morphology and expression and phosphorylation of proteins that comprise the intracellular signaling pathway of mTOR in skeletal muscle of offspring in two stages: birth and weaning. Therefore, initially, 39 rats were divided into two groups, according to the available diet: control (n = 19) and diet (n = 20). After birth, around six pups per mother were killed for sample collection and analysis of the markers investigated. The pups selected to continue the experiment were placed with the mothers who, in turn, were divided into four groups according to gestational and post-gestational diets: CON/CON (n = 8), CON/HL (n = 9), HL/HL (n = 8), HL/CON (n = 7). At the end of lactation, the pups were euthanized and samples were collected for analysis. The results indicate that, for the newborn animals, there is a reduction of serum leptin and IGF-I concentrations and increased phosphorylation of Akt and mTOR in muscle in response to maternal consumption of high fat diet. In turn, we found that maternal high-fat diet during lactation promoted an obese phenotype in weaned animals, with concomitant reduction of muscle development and mTOR target proteins phosphorylation in the postprandial state. Based on these results, we conclude that maternal high-fat diet affects the activity of mTOR, depending on age and physiological condition of the animals.

Keywords: High-fat diet. Gestation. Lactation. MTOR. Offspring. Muscle development.

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Modelo simplificado proposto para a transdução do sinal gerado pelo reconhecimento da insulina e do IGF-1 e ativação da via do mTOR..... | 35 |
| Figura 2. Modelo de regulação da via do mTOR em resposta (A) à insulina e ao IGF-1 e (B) à insulina e ao IGF-1 em uma condição de nutrição excessiva..... | 38 |
| Figura 3. Desenho experimental..... | 46 |
| Figura 4. Consumo absoluto e energético das rações experimentais pelas matrizes durante o período de intervenção..... | 60 |
| Figura 5. Evolução ponderal materna durante o período experimental..... | 61 |
| Figura 6. Evolução ponderal individual dos filhotes..... | 62 |
| Figura 7. Expressão e fosforilação da Akt1 no músculo gastrocnêmio dos animais neonatos..... | 64 |
| Figura 8. Expressão e fosforilação do mTOR no músculo gastrocnêmio dos animais neonatos..... | 65 |
| Figura 9. Expressão e fosforilação da S6K1 no músculo gastrocnêmio dos animais neonatos..... | 66 |
| Figura 10. Expressão das diferentes subunidades e percentual de fosforilação da subunidade <i>gamma</i> da 4E-BP1 no músculo gastrocnêmio dos animais neonatos..... | 67 |
| Figura 11. Composição química da carcaça dos animais neonatos..... | 68 |
| Figura 12. Composição química da carcaça dos animais lactentes..... | 70 |
| Figura 13. Correlação entre o percentual de adiposidade da carcaça e os diferentes marcadores séricos estudados nos animais lactentes..... | 74 |
| Figura 14. Cortes histológicos referentes aos animais eutanasiados no desmame..... | 75 |
| Figura 15. Correlação entre o percentual de adiposidade da carcaça e os diferentes marcadores morfológicos e histológicos estudados nos animais lactentes..... | 77 |
| Figura 16. Expressão e fosforilação da Akt nos resíduos de treonina 308 e 473 no músculo esquelético dos animais lactentes em período pós-prandial..... | 78 |

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Figura 17. | Expressão e fosforilação do mTOR no resíduo de serina 2448 no músculo esquelético dos animais lactentes em período pós-prandial..... | 79 |
| Figura 18. | Expressão e fosforilação da S6K1 no resíduo de treonina 308 no músculo esquelético dos animais lactentes em período pós-prandial..... | 80 |
| Figura 19. | Expressão das diferentes subunidades e percentual de fosforilação da subunidade <i>gamma</i> da 4E-BP1 no músculo gastrocnêmio dos animais lactentes em período pós-prandial..... | 81 |
| Figura 20. | Expressão e fosforilação da Akt nos resíduos de treonina 308 e treonina 473 no músculo esquelético dos animais lactentes após jejum de 90 minutos..... | 82 |
| Figura 21. | Expressão e fosforilação do mTOR no resíduo de serina 2448 no músculo esquelético dos animais lactentes após jejum de 90 minutos..... | 83 |
| Figura 22. | Expressão e fosforilação da S6K1 no resíduo de treonina 308 no músculo esquelético dos animais lactentes após jejum de 90 minutos..... | 84 |
| Figura 23. | Expressão das diferentes subunidades e percentual de fosforilação da subunidade <i>gamma</i> da 4E-BP1 no músculo gastrocnêmio dos animais lactentes após jejum de 90 minutos..... | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | | Pág. |
|------------------|--|-----------|
| Tabela 1. | Formulação das rações experimentais..... | 43 |
| Tabela 2. | Tamanho das proles, massa corporal e massa de órgãos e tecidos dos filhotes no nascimento..... | 63 |
| Tabela 3. | Marcadores séricos referentes aos animais neonatos..... | 63 |
| Tabela 4. | Massa corporal e massa de órgãos e de tecidos dos filhotes no desmame..... | 69 |
| Tabela 5. | Marcadores séricos referentes aos animais lactentes..... | 73 |
| Tabela 6. | Marcadores histológicos avaliados nos animais lactentes..... | 76 |
| Tabela 7. | Resumo dos resultados obtidos no estudo..... | 86 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| 40S | Subunidade ribossomal de 40S |
| 4E-BP1 | Proteína ligante do fator de iniciação 4E |
| 5'cap | Metilguanossina em 5' |
| ADP | Adenosina difosfato |
| AIN | <i>American Institute of Nutrition</i> |
| Akt1 | Proteína quinase B 1 |
| Akt2 | Proteína quinase B 2 |
| AMP | Adenosina monofosfato |
| AMPK | Proteína quinase ativada por AMP |
| AP-1 | Proteína ativadora 1 |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| CART | Transcrito regulado por cocaína e anfetamina |
| CON | Controle |
| DAG | Diacilglicerol |
| DG | Efeito da dieta gestacional |
| DPG | Efeito da dieta pós-gestacional |
| EDTA | Sal do ácido etilenodiaminotetracético |
| eIF | Fator de iniciação dos eucariotos |
| eIF4A | Fator de iniciação dos eucariotos 4A |
| eIF4B | Fator de iniciação dos eucariotos 4B |
| eIF4E | Fator de iniciação dos eucariotos 4E |
| eIF4G | Fator de iniciação dos eucariotos 4G |
| eIF4F | Complexo de fatores de iniciação dos eucariotos 4F |
| EPI | Tecido adiposo branco epididimal |
| FC | Fator de correção |
| FOXO | <i>Forkhead Box-O</i> |

| | |
|--------------|--|
| GDP | Guanosina difosfato |
| GLUT4 | Transportador celular de glicose 4 |
| GTP | Guanosina trifosfato |
| GTPase | Guanosina trifosfatase |
| HL | Hiperlipídico |
| IGF | Fator de crescimento semelhante à insulina |
| IGF-I | Fator de crescimento semelhante à insulina 1 |
| IGF-II | Fator de crescimento semelhante à insulina 2 |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IR | Receptor de insulina |
| IRS | Substrato do receptor de insulina |
| IRS-1 | Substrato 1 do receptor de insulina |
| IRS-2 | Substrato 2 do receptor de insulina |
| I κ B | Inibidor <i>kappa</i> B quinase |
| JDP2 | Proteína 2 de dimerização com JUN |
| JNK | Proteína quinase de C-Jun-Terminal |
| LST8 | Proteína que interage com mTOR, aumentando sua atividade |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógenos |
| MCP-1 | Proteína quimioatraente de monócitos 1 |
| MIP | Proteína inflamatória de macrófagos |
| MRF | Fator regulatório muscular |
| mTOR | Alvo da Rapamicina em Mamíferos |
| mTORC1 | Complexo mTOR 1 |
| mTORC2 | Complexo mTOR 2 |
| MYF5 | Fator miogênico 5 |
| MyoD | Diferenciador miogênico 1 |
| NPY | Neuropeptídeo Y |

| | |
|------------------|--|
| NRC | <i>National Research Council</i> |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato |
| PBST | Solução salina tamponada com fosfato acrescida de <i>Tween</i> |
| PDK1 | Proteína quinase 1 dependente de fosfatidilinositol |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3 quinase |
| PIP2 | Fosfatidilinositol 3,4 |
| PIP3 | Fosfatidilinositol 3,4,5 |
| PKB/Akt | Proteína quinase B |
| PKC θ | Proteína quinase C <i>theta</i> |
| PMSF | Fenilmetilsulfonil fluorido |
| PPAR γ | Receptor ativado por proliferador de peroxissoma |
| PRAS40 | Substrato de Akt rico em prolina de 40 kDa |
| POMC | Proopiomelanocortina |
| PVC | Cloreto de polivinila |
| RAG | Família de GTPases |
| Raptor | Proteína regulatória associada ao mTOR |
| RET | Tecido adiposo branco retroperitoneal |
| Rheb | Homólogo a Ras enriquecido no cérebro |
| Rictor | Companheiro do mTOR insensível à rapamicina |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RNA _m | RNA mensageiro |
| S6 | Proteína ribossomal S6 |
| S6K1 | Proteína quinase da proteína ribossomal S6 |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> |
| SIN-1 | Proteína interativa 1 de proteína quinase ativada por estresse |
| SOCS3 | Supressor de citocinas 3 |
| SREBP1 | <i>Sterol regulatory element binding protein 1</i> |

| | |
|---------------|---|
| STAT3 | Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 |
| SUB | Tecido adiposo branco subcutâneo |
| TCF | Fator celular T |
| TEMED | Tetrametiletilenediamina |
| TG | Triacilgliceróis |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral <i>alpha</i> |
| TNFR1 | Receptor 1 do TNF |
| TNFR60 | Receptor de fator de necrose tumoral de 60 kDa |
| TNFR80 | Receptor de fator de necrose tumoral de 80 kDa |
| TOP | Trato oligopirimidina terminal |
| TOR | Alvo da Rapamicina |
| TSC1/TSC2 | Complexo tuberina/hamartina |
| TSC2 | Hamartina |
| VLDL | Lipoproteína de densidade muito alta |
| WHO | Organização Mundial da Saúde |
| xMAPTM | <i>Multiple analyte profiling</i> |

SUMÁRIO

| | Pág. |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 20 |
| 2. OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 22 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 22 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA | 23 |
| 3.1 Obesidade..... | 23 |
| 3.1.1 Incidência e prevalência..... | 23 |
| 3.1.2 Etiologia e conseqüências da obesidade..... | 24 |
| 3.1.3 Modelos de obesidade materna e efeitos na prole..... | 24 |
| 3.2 Desenvolvimento muscular esquelético fetal..... | 26 |
| 3.3 Obesidade, inflamação e resistência periférica à insulina..... | 28 |
| 3.4 Ativação da via do mTOR..... | 32 |
| 3.4.1 Dietas hiperlipídicas e atividade do mTOR..... | 36 |
| 3.5 Modelos de obesidade materna e efeitos no desenvolvimento muscular esquelético e na via do mTOR..... | 38 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 4.1 Condições experimentais..... | 41 |
| 4.1.1 Animais..... | 41 |
| 4.1.2 Acasalamento..... | 41 |
| 4.1.3 Rações..... | 42 |
| 4.1.3.1 Dieta controle..... | 42 |
| 4.1.3.2 Dieta hiperlipídica..... | 42 |
| 4.1.4 Manipulação dos animais, determinação do peso corporal e do consumo de ração..... | 43 |
| 4.1.5 Desenho experimental e grupos experimentais..... | 44 |
| 4.1.5.1 Nascimento..... | 44 |
| 4.1.5.2 Desmame..... | 45 |
| 4.1.6 Eutanásia..... | 46 |
| 4.1.6.1 Nascimento..... | 46 |
| 4.1.6.2 Desmame..... | 48 |
| 4.2 Análises..... | 49 |
| 4.2.1 Avaliação da composição corporal..... | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.1.1 Umidade..... | 50 |
| 4.2.1.2 Lipídeos..... | 50 |
| 4.2.5 Marcadores séricos..... | 50 |
| 4.2.5.1 Glicose..... | 50 |
| 4.2.5.2 Triacilgliceróis..... | 51 |
| 4.2.5.3 Colesterol total..... | 52 |
| 4.2.5.4 Proteínas totais..... | 53 |
| 4.2.5.5 Insulina, TNF- α , leptina e IGF-1..... | 54 |
| 4.2.6 Análise morfométrica do músculo esquelético..... | 54 |
| 4.2.7 <i>Western Blotting</i> | 55 |
| 4.2.7.1 Extração de proteínas..... | 55 |
| 4.2.7.2 Determinação das concentrações de proteína nos lisados..... | 56 |
| 4.2.7.3 Preparo do gel de poliacrilamida..... | 56 |
| 4.2.7.4 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE..... | 56 |
| 4.2.7.5 Transferência de proteínas do gel para a membrana..... | 56 |
| 4.2.7.6 Sondagens das proteínas com anticorpos..... | 57 |
| 4.2.7.6 Revelação com sistema Quimioluminescente..... | 57 |
| 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 58 |
| 6. RESULTADOS..... | 59 |
| 6.1 Consumo das rações..... | 59 |
| 6.2 Evolução ponderal..... | 61 |
| 6.2.1 Evolução ponderal materna..... | 61 |
| 6.2.2 Evolução ponderal dos filhotes..... | 61 |
| 6.3 Nascimento..... | 62 |
| 6.3.1 Tamanho das proles, massa corporal e massa de órgãos..... | 62 |
| 6.3.2 Marcadores séricos..... | 63 |
| 6.3.3 <i>Western Blotting</i> | 64 |
| 6.3.3.1 Expressão e fosforilação da Akt..... | 64 |
| 6.3.3.2 Expressão e fosforilação do mTOR..... | 65 |
| 6.3.3.3 Expressão e fosforilação da S6K1..... | 65 |
| 6.3.3.4 Expressão e fosforilação da 4E-BP1..... | 66 |
| 6.3.4 Composição química da carcaça..... | 67 |
| 6.4 Desmame..... | 68 |
| 6.4.1 Massa corporal, massa de órgãos e de tecidos..... | 68 |

| | |
|---|-----------|
| 6.4.2 Composição corporal..... | 69 |
| 6.4.3 Marcadores séricos..... | 71 |
| 6.4.4 Morfometria..... | 75 |
| 6.4.5 <i>Western Blotting</i> - Primeira coleta..... | 77 |
| 6.4.5.1 Expressão e fosforilação da Akt..... | 78 |
| 6.4.5.2 Expressão e fosforilação do mTOR..... | 79 |
| 6.4.5.3 Expressão e fosforilação da S6K1..... | 80 |
| 6.4.5.4 Expressão e fosforilação da 4E-BP1..... | 81 |
| 6.4.6 <i>Western Blotting</i> - Segunda coleta..... | 82 |
| 6.4.6.1 Expressão e fosforilação da Akt..... | 82 |
| 6.4.6.2 Expressão e fosforilação do mTOR..... | 83 |
| 6.4.6.3 Expressão e fosforilação da S6K1..... | 84 |
| 6.4.6.4 Expressão e fosforilação da 4E-BP1..... | 85 |
| 6.5 Resumo dos resultados obtidos..... | 86 |
| 7. DISCUSSÃO..... | 88 |
| 7.1 Ratas gestantes e lactantes recebendo dieta hiperlipídica têm o consumo absoluto reduzido..... | 89 |
| 7.2 Canibalismo..... | 91 |
| 7.3 Dieta hiperlipídica materna provoca alterações na composição corporal dos filhotes no período de desmame..... | 92 |
| 7.4 Aumento da adiposidade corporal relaciona-se com a hipertrigliceridemia e a hipercolesterolemia no desmame..... | 96 |
| 7.5 Alterações na glicemia pós-prandial são dependentes do tempo da coleta e respondem às alterações na composição corporal..... | 97 |
| 7.6 Resultados paradoxais em relação à atividade da via da insulina no músculo esquelético dos animais neonatos..... | 99 |
| 7.7 Redução do desenvolvimento muscular esquelético em resposta ao consumo materno da dieta hiperlipídica é dependente do período de intervenção..... | 100 |

| | |
|--|------------|
| 7.8 Dieta hiperlipídica fetal provoca maior fosforilação do mTOR no músculo esquelético do rato neonato sem aumento da sinalização <i>downstream</i> | 102 |
| 7.9 Dieta hiperlipídica materna no período pós-gestacional afeta a fosforilação das proteínas alvo do mTOR em resposta ao consumo do leite..... | 106 |
| 8. CONCLUSÕES | 109 |
| 9. REFERÊNCIAS | 110 |

1. INTRODUÇÃO

A obesidade infantil representa um importante problema de saúde pública, estando relacionada a alterações morfológicas na vida adulta e à incidência de doenças crônicas não transmissíveis (CHU *et al.*, 1998; MAGAREY *et al.*, 2003; WHO, 2003; WHO, 2006).

Nesse sentido, o alto peso ao nascer e o ganho de peso excessivo no período perinatal, elementos determinantes para o desenvolvimento do fenótipo obesogênico no início da vida, podem sofrer influência de fatores genéticos e ambientais. Em relação aos últimos, destacamos o comportamento materno nos períodos fetal e lactacional como sendo crucial para a programação fenotípica da prole, de modo que mudanças na dieta materna, representadas pelo alto consumo de ácidos graxos saturados, provocam alterações morfológicas que incluem o aumento da adiposidade corpórea e a redução no desenvolvimento muscular esquelético dos descendentes (BAYOL, SIMBI & STICKLAND, 2005). Destacamos, nesse contexto, a notória contribuição da resistência periférica à insulina para a redução no desenvolvimento tecidual.

Na resistência à insulina, a transdução do sinal gerado por esse hormônio está regulada negativamente, resultando na redução da taxa de captação de glicose e na diminuição da atividade do Alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR) (JENSEN & HAYMOND, 1991; TANIGUCHI *et al.*, 2008). Essa proteína é central na regulação do processo de síntese proteica através da ativação de alguns componentes do mecanismo de tradução de RNAm, sendo que a regulação negativa de sua atividade pode resultar em alterações no processo mitogênico e no crescimento do músculo esquelético de mamíferos em desenvolvimento (MA & BLENIS, 2009).

Uma vez que alterações no desenvolvimento muscular podem levar à redução do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos em longo prazo (FORSEN *et al.*, 2000; ERIKSSON *et al.*, 2004), entendemos que o estudo dos mecanismos que as permeiam pode proporcionar uma conexão entre obesidade materna e distúrbios fisiológicos na vida adulta da prole, além de fornecer subsídio para a investigação de possíveis condutas terapêuticas. No entanto, estudos que avaliam marcadores de modulação de síntese proteica no músculo esquelético frente ao consumo materno de dietas hiperlipídicas são

escassos e contraditórios. Ademais, até o momento, desconhecemos a existência de trabalhos que avaliaram esses marcadores em animais neonatos e desmamados provenientes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica gestacional e pós-gestacional.

Nesse sentido, buscamos, com o presente trabalho, avaliar os efeitos do consumo materno de uma dieta hiperlipídica sobre a atividade da via do mTOR no músculo esquelético de animais neonatos e lactentes, dada a sua importância para o crescimento celular e para o desenvolvimento adequado desse tecido.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do consumo de dieta hiperlipídica durante os períodos gestacional e pós-gestacional sobre o desenvolvimento muscular esquelético, sobre a atividade da via de sinalização intracelular mediada pelo mTOR nesse tecido e sobre alguns marcadores séricos e morfológicos da prole no nascimento e no desmame.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito do consumo de uma dieta hiperlipídica ofertada a ratas prenhes sobre a composição corporal, sobre as concentrações séricas de glicose, de insulina, de colesterol total, de triacilgliceróis, de proteínas totais, de leptina, de IGF-I e de TNF α e sobre a expressão e fosforilação das proteínas mTOR, 4E-BP1, S6K1 e Akt1 no músculo esquelético das proles desses animais no nascimento.
- Avaliar a influência do consumo da dieta hiperlipídica materna nos períodos fetal e lactacional sobre a composição corporal, o desenvolvimento muscular esquelético, as concentrações séricas de glicose, de insulina, de colesterol total, de triacilgliceróis, de proteínas totais, de leptina, de IGF-I e de TNF α e sobre a expressão e fosforilação das proteínas mTOR, 4E-BP1, S6K1 e Akt1 no músculo esquelético das proles no desmame em dois períodos distintos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Obesidade

3.1.1 Incidência e prevalência

Países desenvolvidos e subdesenvolvidos atravessam uma epidemia de obesidade que torna-se, nos dias atuais, um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Segundo a *World Health Organization* (WHO), o sobrepeso e a obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que prejudica a saúde (WHO, 2006). Em 2005 a WHO estimava que, no mundo, 1,6 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso, sendo que 400 milhões encontravam-se obesos. Projeções preocupantes para o ano de 2015 apontam prevalência de aproximadamente 2,3 bilhões de adultos com sobrepeso, sendo 700 milhões obesos (WHO, 2006).

Entre mulheres, o *National Health and Nutrition Examination Survey* (1999-2002) identificou prevalência de 26 % de sobrepeso e de 29 % de obesidade nas norte-americanas entre 20 e 39 anos de idade (HEDLEY *et al.*, 2004). Destaca-se, ainda, a tendência evidente para o alto consumo de lipídeos e para o ganho de peso gestacional excessivo, fato que pode influenciar o desenvolvimento intrauterino, afetando diretamente o peso ao nascer e a composição corporal dos filhos (HAUSMAN *et al.*, 1991; BUCKLEY *et al.*, 2005; SIEGA-RIZ *et al.*, 2006).

Nesse contexto, a obesidade infantil já é endêmica em determinadas regiões, fato identificado por diversos estudos epidemiológicos que associam o alto peso ao nascer e o ganho de peso excessivo no primeiro mês de vida com o risco aumentado para esse quadro (MAFFEIS *et al.*, 1994; POPKIN *et al.*, 1995; TANAKA *et al.*, 2001). Atualmente, estima-se que 42 milhões de crianças com até cinco anos de idade estejam acima do peso, sendo que 35 milhões vivam em países em desenvolvimento (WHO, 2010). O sobrepeso dessas crianças predispõe à obesidade, à hipertensão, às doenças cardiovasculares e ao diabetes na vida adulta (CURHAN *et al.*, 1996; CHU *et al.*, 1998; MAGAREY *et al.*, 2003; WHO, 2003; WHO, 2006).

3.1.2 Etiologia e consequências da obesidade

Os principais fatores ambientais associados à epidemia de obesidade acima descrita são a tendência global ao consumo de alimentos ricos em gordura saturada e em açúcares simples e o sedentarismo (WHO, 2006). Estudos epidemiológicos exibem relação direta entre dietas hiperlipídicas, variações na composição corporal — como o aumento da adiposidade corpórea — e uma série de outros efeitos deletérios (POPKIN *et al.*, 1995; BROWN *et al.*, 2002; SICHIERI, 2002; TENE *et al.*, 2003). Dentre esses efeitos, podemos destacar a maior prevalência de doenças cardiovasculares, a sensibilidade à insulina diminuída e o posterior desenvolvimento do diabetes tipo II (LOVEJOY & DIGIROLAMO, 1992; XU *et al.*, 2006).

Em estudos com modelos animais, dietas com alto teor energético têm proporcionado aumento nas concentrações de triacilgliceróis séricos, plasmáticos e hepáticos e acúmulo de gordura visceral. Em ratos, esse acúmulo é caracterizado pelo aumento do volume dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal, sugerindo obesidade central que, em humanos, está relacionada à síndrome metabólica (NADERALI *et al.*, 2001; CHALKLEY *et al.*, 2002; YAMAGUCHI *et al.*, 2010). Cabe salientar que o tipo de gordura da dieta também influencia o desenvolvimento dessas doenças, havendo relação entre o consumo de dietas ricas em ácidos graxos saturados e *trans* e o desenvolvimento das doenças cardiovasculares e do diabetes, sendo, essa relação, inversamente proporcional quando do consumo de dietas ricas em ácidos graxos mono e polinsaturados (KUSHI *et al.*, 1985; PIETINEN *et al.*, 1997; OH *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006).

3.1.3 Modelos de obesidade materna e efeitos na prole

Muitos dos conhecimentos atuais relativos à importância da nutrição fetal foram derivados de pesquisas em animais. Nos roedores, o impacto da nutrição materna induz efeitos sobre o comportamento alimentar, as funções metabólicas, o metabolismo proteico e o desenvolvimento muscular esquelético da prole (HAUSMAN *et al.*, 1991; LUCAS, 1991; BAYOL *et al.*, 2005; BUCKLEY *et al.*, 2005).

Diante desses resultados, afirma-se que o consumo de dietas hiperlipídicas durante a gestação e a lactação pode predispor ao desenvolvimento de doenças metabólicas em longo prazo, fato que pode, em parte, ser explicado pela hipótese de programação fetal, proposta por Barker (1997), que foi definida como um processo adaptativo a um ambiente adverso intrauterino que resulta na redefinição dos processos de desenvolvimento, garantindo a sobrevivência fetal. Essa hipótese baseou-se em diversas observações epidemiológicas nas quais o baixo peso ao nascer relacionava-se às doenças metabólicas na vida adulta, propondo que, quando os fetos são expostos a um suprimento limitado de nutrientes, eles adaptam-se a esta situação. Tal adaptação provoca alterações morfológicas, fisiológicas, metabólicas e epigenéticas, podendo levar a grande número de doenças na vida adulta (VICKERS *et al.*, 2001; BRØNS *et al.*, 2010; TAMASHIRO & MORAN, 2010).

Em relação aos dias atuais, gestantes subnutridas representam pequena parcela da população brasileira (MONTEIRO, CONDE & POPKIN, 2002). Por sua vez, o consumo predominante de alimentos de alta densidade calórica por esse grupo acarreta diversos efeitos durante a vida adulta de seus filhos: aumento do volume do tecido adiposo, doenças cardiovasculares e resistência à insulina, entre outros (TUCKER *et al.*, 1997; ARNITAGE *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2006). Vale ressaltar que estudos envolvendo o consumo de dietas hiperlipídicas demonstram que o período de amamentação é crítico para a programação do fenótipo obesogênico, de hiperleptinemia e de hipertensão nas proles (SCHMIDT *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2004; PLAGEMAN, 2005; TAYLOR & POSTON, 2007).

O leite materno é considerado um alimento complexo, que propicia, tanto elementos nutritivos quanto bioativos, que conferem benefícios para o crescimento, o desenvolvimento e a saúde de animais lactentes (PICCIANO & MCDONALD, 2006). Para a sua produção, cinco importantes processos secretórios ocorrem no complexo alveolar: exocitose de proteínas lácteas, de lactose e de outros elementos hidrofílicos, por meio das vesículas secretórias do Golgi; síntese de gotas lipídicas no citoplasma, que se movem até a membrana apical para posterior secreção na forma de glóbulos envolvidos por bicamada lipídica proveniente da própria célula alveolar; transporte transcelular

de íons monovalentes, água e lactose do espaço intersticial para a luz alveolar; transcitose vesicular de proteínas do espaço intersticial; e transporte paracelular de componentes séricos e de leucócitos (MCMANAMAN & NEVILLE, 2003). Todos esses mecanismos influenciam a composição final do leite materno e seu valor biológico.

Nesse contexto, os ácidos graxos que compõem os glóbulos lipídicos do leite são derivados de síntese *de novo* na glândula mamária, a partir de lipídeos obtidos na dieta ou mobilizados do tecido adiposo (WILLIAMSON & LUND, 1993). Variações na distribuição dos ácidos graxos da dieta e/ou na composição corporal materna influenciam diretamente a concentração e a composição dos lipídeos secretados durante a produção láctea e, conseqüentemente, afetam o crescimento da prole. Nesse sentido, os efeitos provocados pela obesidade materna sobre os lactentes podem ser atribuídos às alterações da concentração e da composição de ácidos graxos do leite que serve de alimento para esses animais no início da vida.

Assim, acredita-se que tanto o período fetal quanto o período lactacional sejam determinantes para o estabelecimento do fenótipo no início da vida, havendo grande influência da dieta e do estado nutricional materno sobre esse processo. Dentro dessa perspectiva, Bayol, Simbi & Stickland (2005) verificaram que o consumo materno de dieta composta por alimentos de alta densidade energética — ricos em carboidratos simples e ácidos graxos saturados —, durante a gestação e a lactação, causou atrofia e acúmulo de lipídeos no músculo esquelético dos filhotes ao final do período lactacional, caracterizando redução no desenvolvimento muscular esquelético. Os autores verificaram também que essa redução foi mais acentuada do que a ocorrida em um modelo no qual ratos da mesma linhagem foram submetidos à desnutrição materna severa (BAYOL *et al.*, 2004). Neste caso, é notória a relação entre a resistência à insulina induzida pelo consumo da dieta hipercalórica e a redução no desenvolvimento do músculo esquelético.

3.2 Desenvolvimento muscular esquelético fetal

Como foi comprovado nos estudos conduzidos por Bayol e seus colaboradores (2005, 2009), o consumo de açúcares refinados e de gordura

saturada causa alterações no metabolismo muscular. Anderson *et al.* (2008) propõem que a obesidade induzida pelo consumo de dieta rica em ácidos graxos provoca redução da síntese proteica no músculo esquelético em estado pós-prandial, efeito atribuído à possível redução na sensibilidade à insulina.

O músculo esquelético, tradicionalmente entendido como um tecido essencial para a locomoção de animais, alcança *status* de órgão metabólico, dada a sua participação no metabolismo de ácidos graxos, aminoácidos e glicose. Por essa razão, autores da área propõem que o desenvolvimento e a manutenção desse tecido têm vital importância para a homeostase e para a prevenção de diversas doenças metabólicas.

Nesse sentido, o estágio de desenvolvimento fetal recebe grande atenção, por ser crucial no desenvolvimento da musculatura esquelética, uma vez que este compreende o único período de proliferação de fibras musculares, não havendo aumento de seu número após o nascimento (DU *et al.*, 2010). Nesse contexto, o desenvolvimento fetal reduzido pode levar à diminuição do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos em resposta ao estímulo pela insulina, predispondo ao acometimento da obesidade e do diabetes em longo prazo (FORSEN *et al.*, 2000; ERIKSSON *et al.*, 2004). Assim, o estudo das alterações no desenvolvimento do tecido muscular esquelético pode proporcionar uma conexão entre obesidade materna e diversos distúrbios na vida adulta.

Os miócitos são derivados de células mesenquimais que primeiramente diferenciam-se em células precursoras, em um mecanismo que inclui a atividade de diversos fatores de transcrição, incluindo os fatores regulatórios miogênicos (MRF) (DU *et al.*, 2010). O desenvolvimento dessas células compreende três estágios, a saber: embriogênico, fetal e pós-natal, havendo maior produção de fibras musculares no segundo estágio (STICKLAND *et al.*, 1978).

Entretanto, parte das células mesenquimais do músculo fetal pode diferenciar-se em adipócitos, em processo iniciado na metade do período gestacional. A maior parte das células adiposas recém-formadas em adultos está localizada no tecido adiposo visceral, enquanto que aquelas localizadas ectopicamente, caso da gordura intramuscular, são diferenciadas majoritariamente durante o desenvolvimento fetal (TONG *et al.*, 2008). Assim, a

adipogênese ocorrida no músculo esquelético nesse período é determinante para a magnitude do acúmulo de adipócitos no tecido, predispondo à maior concentração de ácidos graxos durante a vida pós-fetal e posterior resistência à insulina (AGUIARI *et al.*, 2008).

Nesse contexto, alguns autores propõem que parte dos efeitos observados no desenvolvimento da musculatura esquelética em animais, cujas mães foram submetidas ao excesso de consumo alimentar, reflete a redução na sensibilidade deste tecido a hormônios anabólicos como a insulina e o IGF-I (ZHU *et al.*, 2008). Com base nessas afirmações, pode-se supor que o consumo materno de dietas com alto teor energético também seja determinante na redução da síntese proteica e na atrofia muscular das proles, efeito este relacionado à redução da transdução do sinal na via da insulina. Acredita-se, dessa forma, que alterações na dieta materna durante o desenvolvimento fetal influenciam na homeostase das proles, levando a quadro de inflamação e resistência à insulina, com possível redução do desenvolvimento muscular e da atividade de vias de síntese proteica no músculo esquelético da prole.

Baseado nessa afirmação, o estudo de Zhu *et al.* (2008) demonstrou que ovelhas prenhas, submetidas ao consumo de dieta correspondendo a 150 % das recomendações propostas pelo *National Research Council* (NRC), geraram fetos com redução da atividade das proteínas relacionadas à via de síntese promotora do aumento da tradução de RNAm no músculo esquelético. Esse efeito foi acompanhado do aumento da fosforilação do substrato de receptor de insulina 1 (IRS-1) no resíduo de serina 1011 e da redução da atividade da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), fatos relacionados à redução da transdução do sinal da insulina.

3.3 Obesidade, inflamação e resistência periférica à insulina

O primeiro estudo relacionando aumento da massa corporal e redução na sensibilidade periférica à insulina data da década de 1960, sendo que estudos epidemiológicos mais recentes relacionam o sobrepeso ao risco aumentado para o acometimento do diabetes (RABINOWITZ & ZIERLER, 1962; COLDITZ *et al.*, 1995).

Indivíduos sobrepesados e obesos tendem a apresentar maior acúmulo de ácidos graxos no tecido adiposo branco que, atualmente, é considerado um órgão endócrino que secreta diversos compostos que possuem atividade autócrina, parácrina e endócrina (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007). Este conceito se sobrepõe à crença anterior de que o tecido adiposo representaria apenas um reservatório de energia que também atua como isolante térmico. Na progressão da obesidade, as células adiposas são hipertrofiadas em resposta ao acúmulo de moléculas de ácidos graxos. Com o aumento do volume, os adipócitos passam a expressar e secretar maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias, dentre as quais destacam-se a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), primeira adipocina a ser associada diretamente à resistência à insulina (PEKALA *et al.*, 1983; MORIN *et al.*, 1997; WEISBERG *et al.*, 2003).

O aumento nas concentrações séricas de TNF- α provoca inflamação e redução na sensibilidade à insulina no próprio tecido adiposo, reduzindo a lipogênese e aumentando a lipólise, com consequente liberação de ácidos graxos para o plasma (NIETO-VASQUEZ *et al.*, 2008). Adicionalmente, a expressão de diversos genes é alterada pelo reconhecimento do TNF- α por seus receptores de membrana (TNFR60 e TNFR80), resultando em maior síntese de outros elementos pró-inflamatórios, caso da proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) e de proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP) (LEE *et al.*, 2005, GIL *et al.*, 2007). Essas proteínas induzem a atração e a infiltração de monócitos no tecido adiposo, que são diferenciados em macrófagos e passam a expressar linfocinas que ajudam a manter ou a potencializar a inflamação sistêmica (LUMENG *et al.*, 2007).

Tanto o TNF- α quanto os ácidos graxos livres liberados do tecido adiposo são apontados como os principais promotores da redução da sensibilidade à insulina em outros tecidos e órgãos metabolicamente ativos, como o músculo esquelético e o fígado (CHAVEZ & SUMMERS, 2003; FRANGIOUDAKIS & COONEY, 2005; WEI *et al.*, 2008; VAN DEN BERG, 2010). Uma vez que o músculo esquelético é responsável por cerca de 80 % do metabolismo da glicose em condições fisiológicas, a redução da sensibilidade à insulina nesse órgão torna-o central para o desenvolvimento do diabetes (DeFRONZO *et al.*, 1981).

Na resistência periférica à insulina, a atividade da via de sinalização intracelular sensível à concentração desse hormônio encontra-se reduzida (TANIGUCHI *et al.*, 2008). Essa via compreende diversas proteínas citoplasmáticas que comunicam-se entre si, promovendo a transdução do sinal gerado pelo reconhecimento da insulina por seu receptor específico.

Inicialmente, o receptor de membrana se autofosforila, promovendo a ativação de proteínas conhecidas como substratos de receptor de insulina (IRS), dentre os quais destacam-se as isoformas 1 e 2, por serem amplamente distribuídas entre os diversos tipos celulares e por serem as mais ativas no músculo e no fígado, respectivamente (ARAKI *et al.*, 1994; YAMAGUCHI *et al.*, 1996). Uma vez ativadas, estas promovem o estímulo da PI3K, que fosforila fosfolípidos de membrana, promovendo a migração e a ativação da proteína quinase B (PKB/Akt). Das 3 isoformas de Akt existentes, a Akt2 é, reconhecidamente, a mais expressa em tecidos sensíveis à insulina e está relacionada a alterações na organização conformacional do citoesqueleto, com aumento da translocação de GLUT4 para a membrana celular e, conseqüentemente, da captação de glicose, enquanto que a Akt1 está relacionada, principalmente, a processos anabólicos (CHEATHAM *et al.*, 1994; ALESSI *et al.*, 1997; TANIGUCHI *et al.*, 2008).

A secreção de elementos pró-inflamatórios e o aumento na concentração de ácidos graxos livres no sangue são apontados como importantes fatores relacionados à redução na transdução do sinal nessa via (CHAVEZ & SUMMERS, 2003; WEI *et al.*, 2008). Há consenso de que o TNF- α é capaz de desencadear uma cascata de eventos sinalizatórios que culmina na ativação de uma proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), denominada C-Jun-terminal quinase (JNK), e do inibidor do fator nuclear B quinase *beta* (I κ B), os quais são também alvo da sinalização por ácidos graxos não esterificados reconhecidos por receptores de membrana do tipo *Toll like* (HIROSUMI *et al.*, 2002; NGUYEN *et al.*, 2005, ITAUI *et al.*, 2002). Acredita-se que ambas as vias tenham relação com o desenvolvimento da resistência à insulina, uma vez que a redução da atividade dessas proteínas ou a deleção dos genes que as expressam promove o restabelecimento da sensibilidade a esse hormônio (HIROSUMI *et al.*, 2002).

Tanto a JNK quanto a I κ B β têm como alvo comum o resíduo de serina 307 do IRS-1. A fosforilação em resíduos de serina do substrato torna-o menos sensível à atividade tirosina quinase do IR e passível de degradação, o que prejudica toda a sinalização *downstream*, bem como a translocação do GLUT-4 para as membranas celulares (LEE *et al.*, 2003; BOUZAKRI & ZIERATH, 2007). Esse é um exemplo de como as citocinas pró-inflamatórias e os ácidos graxos livres podem atuar na sensibilidade periférica à insulina.

Outro mecanismo descrito propõe que os ácidos graxos livres também atuem aumentando a atividade inibitória da proteína quinase C *theta* (PKC θ) (GRIFFIN *et al.*, 1999). No músculo, a exposição excessiva a ácidos graxos saturados resulta no acúmulo de lipídeos intramusculares na forma de diacilgliceróis (DAG), que atuam sobre essa proteína quinase. Uma vez ativada, esta tem como alvo o resíduo de serina 307 do IRS-1, exercendo efeitos semelhantes aos da JNK (HEGARTY *et al.*, 2003).

Com a redução da sensibilidade à insulina, identificamos um quadro de hiperinsulinemia compensatória, que é bem tolerada em curto prazo, mas que, cronicamente, pode exacerbar a resistência (WHITE, 2003). Diferentemente de outros fatores, que parecem afetar apenas a IRS-1, a hiperinsulinemia promove a ubiquitinação e a degradação desse substrato e também atua na redução das taxas de transcrição do RNAm que é traduzido em IRS-2, regulando negativamente a sua expressão. Ambos os mecanismos contribuem para a manutenção da resistência periférica ao hormônio (HIRASHIMA *et al.*, 2003).

Dessa forma, as propriedades anabólicas e antiproteolíticas da insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) podem, em grande parte, estar inibidas (JENSEN & HAYMOND, 1991; ANDERSON *et al.*, 2008), dando margem a especulações que propõem que a administração de dietas hiperlipídicas pode reduzir as taxas de crescimento e de síntese proteica no músculo, através da redução da ativação da via da insulina. Destacamos esse sistema como sendo um regulador chave do crescimento celular via ativação de células satélites e da síntese proteica.

3.4 Ativação da via do mTOR

Como citado anteriormente, a insulina é capaz de ativar uma via de sinalização intracelular que está relacionada à translocação do GLUT4 e, conseqüentemente, à captação de glicose nos tecidos sensíveis a esse hormônio. Porém, a atividade da Akt não está relacionada exclusivamente com o metabolismo da glicose. Através dessa via, tanto a insulina quanto o IGF-I também podem regular a atividade de uma proteína quinase relacionada ao estímulo à síntese proteica conhecida como mTOR. Uma vez fosforilada no processo de sinalização pela insulina, a Akt1 atua reduzindo a atividade do complexo tuberina/hamartina (TSC1/TSC2) que, quando ativado, inibe a ação do Rheb (Homólogo de Ras enriquecido no cérebro), um efetor positivo do mTOR.

A descoberta do mTOR em meados da década de 1990 proporcionou significativo avanço no levantamento da função da insulina e de outros mitógenos na regulação da síntese proteica (BROWN *et al.*, 1994; CHIU *et al.*, 1994; SABATINI *et al.*, 1994). Em mamíferos, o TOR pode compor dois complexos fisicamente distintos (mTORC1 e mTORC2), dentre os quais destacamos o complexo mTOR 1 (mTORC1) por estar relacionado diretamente aos processos de síntese proteica, crescimento, divisão e diferenciação celular mediados por nutrientes. Este complexo é composto pelo mTOR ligado a raptor (proteína regulatória associada ao mTOR) e à LST8, ambas sensíveis à regulação por nutrientes (HARA *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2003; KIM & SABATINI, 2004; STIPANUK, 2007).

O complexo TOR 2, por sua vez, é composto por rictor (proteína associada ao mTOR insensível à rapamicina), LST8 e proteína interativa de proteína quinase ativada por estresse 1 (SIN-1), além do próprio mTOR. Diferentemente do complexo 1, o mTORC2 não tem relação direta com o processo anabólico, mas é responsável por regular positivamente a atividade da Akt (SARBASSOV *et al.*, 2005). Quando ativado, esse complexo fosforila a Akt no resíduo de treonina 478, sendo, este efeito, necessário para a sua completa ativação.

A ativação do mTOR ainda não está totalmente elucidada, mas é influenciada por proteínas regulatórias, incluindo o complexo

tuberina/hamartina e a Rheb (NOJIMA *et al.*, 2003; LONG *et al.*, 2005; MARTIN & HALL, 2005). A Rheb corresponde a uma GTPase que regula positivamente a atividade do mTOR *in vivo* e que sofre oposição do complexo TSC1/TSC2 (GAO & PAN, 2001; TAPON *et al.*, 2001; POTTER *et al.*, 2002). Nessa perspectiva, alguns autores propõem que a TSC2 é sensível a fatores de crescimento (incluindo a insulina e os IGF) e à capacidade energética intracelular, calculada a partir da relação entre as concentrações de adenosina trifosfato (ATP) e de adenosina monofosfato (AMP) (ATHERTON *et al.*, 2005).

Assim, o caminho pelo qual acredita-se que hormônios anabólicos promovam o aumento da atividade do mTOR inclui a redução da atividade do complexo TSC1/TSC2, através da fosforilação de diversos resíduos aminoacídicos da TSC2 pela Akt durante a transdução do sinal da insulina e do IGF-I. Uma vez fosforilada, é criado um sítio de ligação na TSC2 para a proteína citosólica 14-3-3, de modo que o complexo tem sua função inibitória sobre o Rheb reduzida, permitindo a este alcançar seu estado de maior atividade (Rheb-GTP) e fosforilar o mTOR (MA & BLENIS, 2009).

Há, ainda, evidências de que a Akt poderia atuar sobre o mTOR independentemente do complexo TSC1/TSC2 (HAAR *et al.*, 2007). Alguns autores acreditam que esta proteína é capaz de fosforilar uma proteína ligada ao mTOR, denominada substrato da Akt rica em prolina (PRAS40), e que esta também seria alvo de fosforilação pelo mTOR ativado, competindo com as demais proteínas que compõem a transdução do sinal nessa via (ver figura 1). Quando a PRAS40 é fosforilada pela Akt, esse substrato cria afinidade pela proteína 14-3-3, ligando-se a ela e permitindo que o mTOR exerça sua atividade estimulatória (WANG *et al.*, 2008).

Uma vez ativado, o mTOR tem a capacidade de regular o processo de síntese proteica nos mamíferos, através da alteração de alguns componentes do mecanismo de tradução de RNAm.

O primeiro elemento a ser relacionado a ele foi a proteína quinase de 70kDa, que fosforila a proteína ribossomal S6 (S6K1). A ativação da S6K1 ocorre por fosforilação pelo mTOR no resíduo de treonina 389 e tanto a fosforilação quanto a ativação desta proteína são bloqueadas pela rapamicina (AVRUCH *et al.*, 2001). Com a fosforilação pelo mTOR, é criado na S6K1 um sítio de acoplamento para interação com a PDK1, uma proteína estimulada

pela insulina, que a fosforilará no resíduo de treonina 229, tornando-a funcional e capaz de regular positivamente a atividade da proteína ribossomal S6, cuja principal função é promover a tradução de um grupo de RNA mensageiros que possuem um trato oligopirimidina terminal situado na região 5' não traduzida do RNAm (TOP RNAm) (AVRUCH *et al.*, 2001; MARTIN & BLENIS, 2002). Esse tipo de ácido nucleico é composto por uma sequência de nucleotídeos rica em citosinas e uracilas em uma região não codificada do RNAm, situada anteriormente ao códon de iniciação e cuja tradução resulta em proteínas ribossomais e em outros fatores de tradução, conduzindo ao aumento na capacidade celular para a síntese proteica (PROUD, 2004).

O segundo elemento relacionado à tradução, responsivo à atividade do mTOR, é denominado proteína ligadora do fator de iniciação 4E (4E-BP1). Os componentes básicos para a síntese proteica incluem proteínas catalíticas identificadas como fatores de iniciação dos eucarióticos (eIF), assim chamados por atuarem no processo de iniciação da tradução do RNAm. Dentre estes, destacamos o eIF4E e o eIF4G, responsáveis pelo acoplamento da subunidade ribossomal 40S ao RNAm (GINGRAS *et al.*, 1999). Em condições basais, grande parte do eIF4E encontra-se ligado à 4E-BP1 e, desta forma, impossibilitado de exercer sua função anabólica. Quando a 4E-BP1 é fosforilada pelo mTOR no resíduo de treonina 70, esta libera o eIF4E para formar o complexo eIF4F composto também pelos fatores eIF4A, eIF4B e eIF4G (GINGRAS *et al.*, 1999). O eIF4E é uma proteína que ancora o complexo eIF4F à estrutura 5' cap do RNAm, enquanto que os outros três correspondem, respectivamente, a uma helicase ATP-dependente, responsável por desnaturar as estruturas secundárias na região 5' não traduzida que dificultam ou inibem a leitura do RNAm, a um cofator da eIF4A, que atua aumentando a afinidade dessa molécula por ATP, e a um peptídeo que atua como ligante entre eIF4E, eIF4A, eIF4B, RNAm e a subunidade 40S (ROZEN *et al.*, 1990; SONENBERG, 1996; MA & BENIS, 2009).

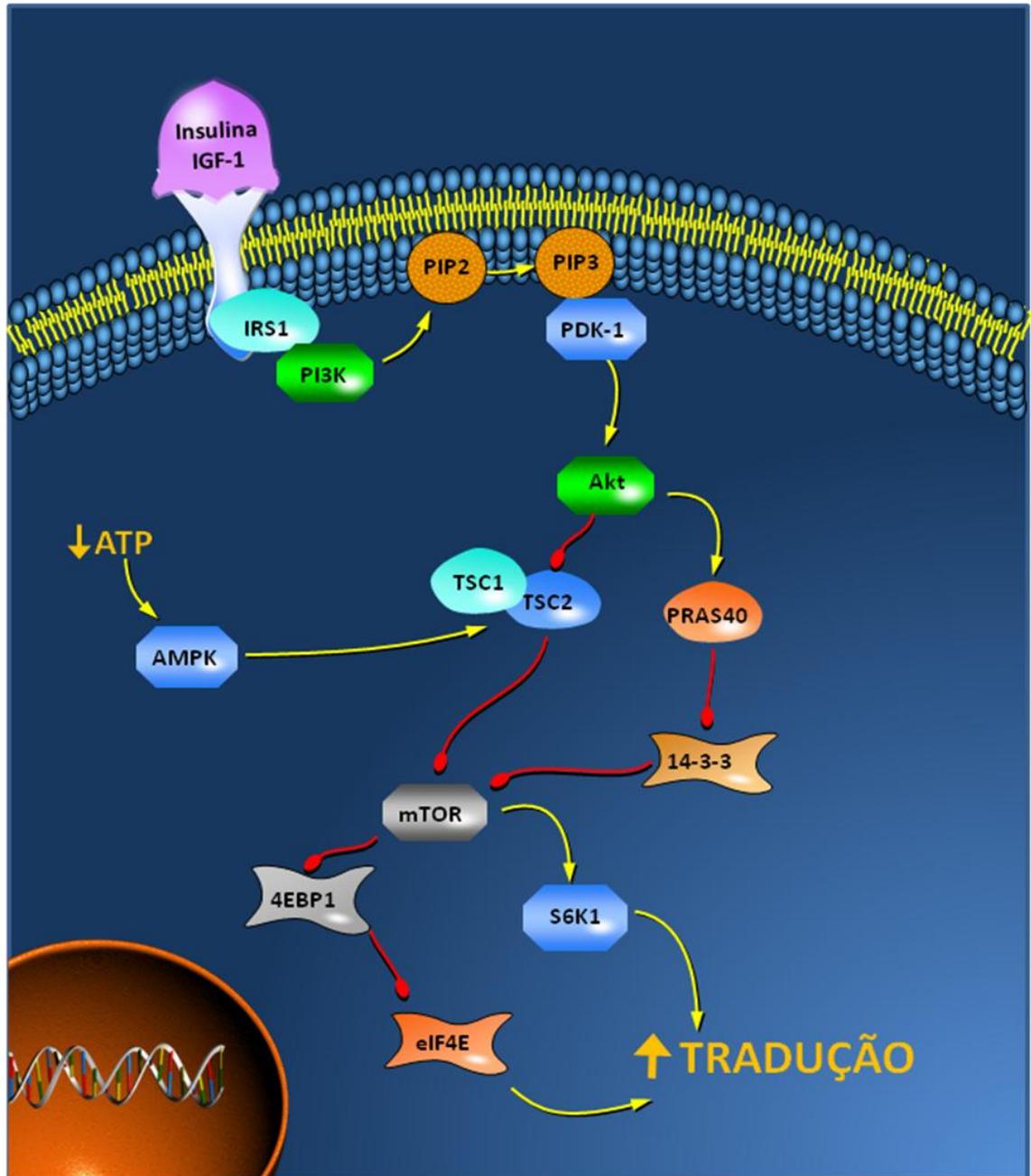


Figura 1. Modelo simplificado proposto para a transdução do sinal gerado pelo reconhecimento da insulina e do IGF-I e para a ativação da via do mTOR.

4E-BP1: proteína ligadora do fator de iniciação 4E; Akt: proteína quinase B; AMPK: proteína quinase dependente de AMP; ATP: adenosina trifosfato; eIF4E: fator de iniciação 4E; IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina 1; IRS1: substrato de receptor de insulina 1; mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos; PDK: proteína quinase dependente de fosfatidilinositol; PI3K: fosfatidilinositol 3 quinase; PIP2: fosfatidilinositol 2 fosfato; PIP3: fosfatidilinositol 3 fosfato; PRAS40: substrato da Akt rica em prolina; S6K1: proteína quinase S6; TSC1/TSC2: complexo tuberina/hamartina.

Recentemente, propôs-se que a atividade do complexo eIF4F também estaria regulada pela S6K1, de modo que esta proteína poderia fosforilar a eIF4B, recrutando-a para atuar como co-fator da eIF4A e fosforilar a proteína *Programmed Cell Death 4* (PDCD4) que inibe a atividade da eIF4A (YANG *et*

al., 2003; RAUGHT *et al.*, 2004; DORRELLO *et al.*, 2006). Uma vez fosforilada pela S6K1, a PDCD4 libera a eIF4A, sendo rapidamente ubiquitinada e degradada. Livre e com o recrutamento de seu co-fator, a eIF4A pode realizar sua função de helicase, permitindo que os chamados “grampos”, formados a partir do pareamento de bases dos nucleotídeos, sejam desfeitos (ROZEN *et al.*, 1990; SONENBERG, 1996; NORTON & LAYMAN, 2006; MA & BENIS, 2009).

3.4.1 Dietas hiperlipídicas e atividade do mTOR

Como foi demonstrado, a via do mTOR é capaz de transmitir sinais intra e extracelulares provenientes do estado nutricional, do estado metabólico e dos hábitos alimentares de um indivíduo, modulando a atividade de fatores que atuam na regulação das taxas de tradução de RNAm no músculo esquelético.

Nesse sentido, alguns estudos, utilizando modelos experimentais de obesidade induzida por dietas hiperlipídicas, demonstraram resultados conflitantes. Um estudo envolvendo o consumo crônico de dietas hiperlipídicas observou redução da ativação de proteínas relacionadas à via do mTOR com concomitante redução da atividade da Akt em resposta a uma sobrecarga funcional do músculo plantar (SITNICK *et al.*, 2009). Em contraste, estudos anteriores haviam observado aumento da fosforilação do mTOR e de seu alvo – S6K1 – no músculo esquelético de ratos submetidos a dieta hiperlipídica por 4 semanas, mesmo em períodos de jejum (KHAMZINA *et al.*, 2005). Em ambos os casos, a hipótese dos autores gira em torno de alterações fisiológicas que incluem a hiperinsulinemia.

Com o excesso crônico de nutrientes, quadro comum na obesidade, a atividade da via do mTOR é mantida por período prolongado. Entre outros efetores que participam nesse processo, destaca-se a proteína quinase dependente de AMP (AMPK) (figura 1), um sensor energético regulado pela relação entre as concentrações intracelulares de ATP e AMP (DENNIS *et al.*, 2001; RIVAS *et al.*, 2009). Acredita-se que a inativação da AMPK pelo aumento do balanço energético esteja relacionada com a desfosforilação da TSC2 em

dois sítios de regulação positiva, o que leva à redução da inibição que essa proteína impõe sobre o TOR (INOKI *et al.*, 2003).

A AMPK também pode ser regulada negativamente pela sinalização por TNF α , hiperexpresso na obesidade. No entanto, com a inibição dessa enzima, há acúmulo de gordura intramuscular e redução da peroxidação, o que pode, em longo prazo, levar à resistência periférica à insulina e à possível redução da atividade dos componentes da via do mTOR (STEINBERG *et al.*, 2006).

Cabe ainda ressaltar que, em indivíduos obesos, pode ser observado aumento da concentração de aminoácidos circulantes, sendo este, um efeito que corrobora a hipótese de que, na obesidade, a via do mTOR poderia estar mais ativada (FELIG *et al.*, 1974; KHAMZINA *et al.*, 2005).

Evidências atuais demonstram que o aumento nas concentrações intracelulares de aminoácidos provoca a fosforilação de uma molécula de GDP que está conjugada à subunidade B de um complexo proteico conhecido como RAG. Esse efeito dos aminoácidos ainda não está totalmente esclarecido, mas, uma vez ocorrida a fosforilação, a GDP se torna trifosfatada (GTP) e o complexo RAG ativado. O complexo provoca, então, a fosforilação do mTOR, que translocará para uma região da célula rica em Rheb e sofrerá ativação completa (MA & BLENIS, 2010). Mais uma vez, ressaltamos que a Rheb pode ser regulada positivamente pelas concentrações séricas de IGF-I e de insulina. Dessa forma, observamos que o mTOR pode ser ativado pelo aumento da concentração de aminoácidos circulantes, sendo, esse efeito, possivelmente potencializado pela ação de hormônios anabólicos (ANTHONY *et al.*, 2002).

Com a ativação crônica do mTOR em condições de *overnutrition*, acredita-se que a atividade do complexo 2 esteja reduzida, não ocorrendo a ativação completa da Akt. Ademais, a fosforilação persistida da S6K1 pode provocar a redução da atividade da IRS-1 através da fosforilação do resíduo de serina 1011. Ambos os mecanismos atuam na promoção da resistência à insulina em longo prazo (figura 2).

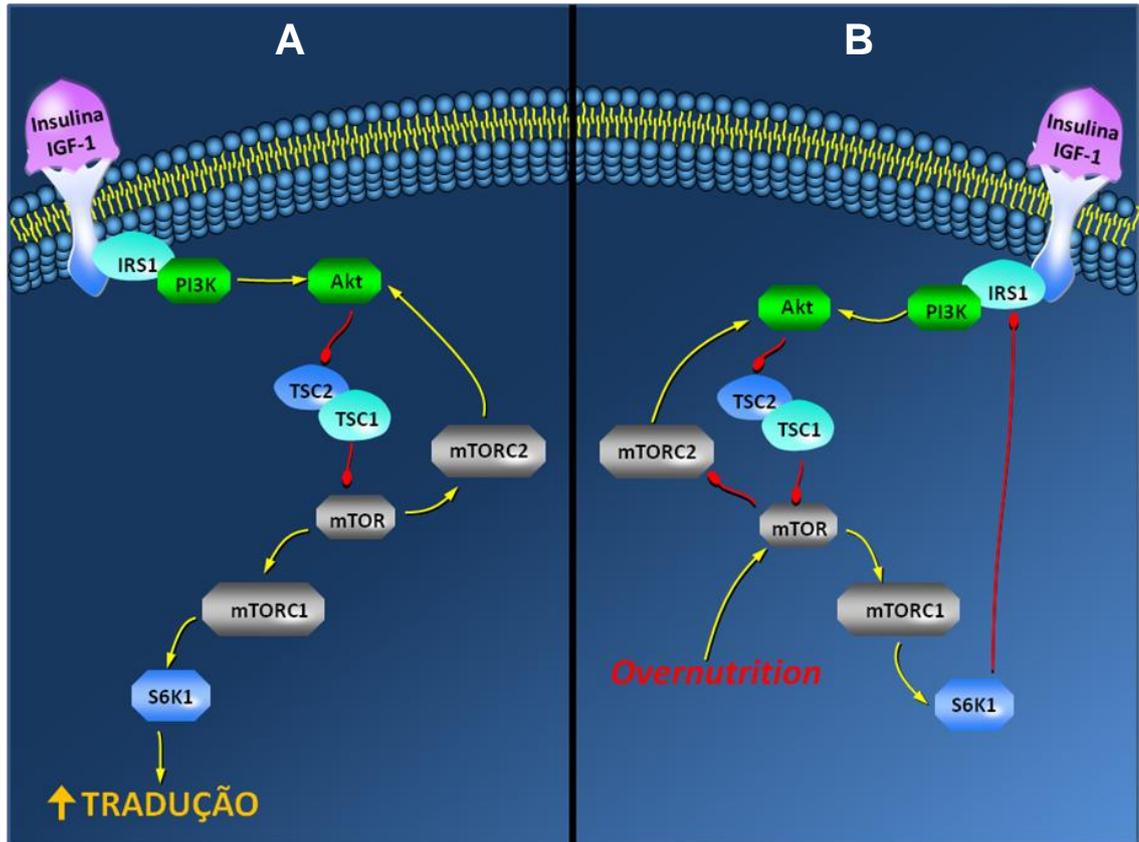


Figura 2. Modelo de regulação da via do mTOR em resposta (A) à insulina e ao IGF-I e (B) à insulina e ao IGF-I em uma condição de excesso de nutrientes (Adaptado de Rivas *et al.*, 2009).

Akt: proteína quinase B; IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina; IRS1: substrato de receptor de insulina 1; mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos; mTORC1: complexo mTOR 1; mTORC2: complexo mTOR 2; PI3K: fosfatidilinositol 3 quinase; S6K1: proteína quinase S6; TSC1/TSC2: complexo tuberina/hamartina

A partir dos resultados dos estudos citados, percebemos a existência de contradições no que concerne à regulação da atividade da via do mTOR pela obesidade induzida por dietas hiperlipídicas. Tais diferenças podem estar relacionadas ao tempo de exposição e à composição das rações, bem como às diferenças metodológicas que incluem a interferência de outros fatores além da dieta.

3.5 Modelos de obesidade materna e efeitos no desenvolvimento muscular esquelético e na via do mTOR

Comentamos o efeito das dietas hiperlipídicas no desenvolvimento muscular esquelético das proles. Agora, discutiremos os possíveis mecanismos implicados nesse processo, estudados até o momento.

Em quadros de obesidade materna, acredita-se que a inflamação resultante possa regular a diferenciação das células mesenquimais musculares e, conseqüentemente, o desenvolvimento muscular fetal. Esse efeito ocorre através da ativação da JNK, que fosforila o fator de transcrição proteína ativadora 1 (AP-1), que, por sua vez, dimeriza com JDP2, inibindo a atividade transcriptórica da AP-1 e, conseqüentemente, a miogênese (OSTROVSKY *et al.*, 2002).

Além disso, o processo inflamatório leva ao aumento da atividade de um fator transcripcional conhecido como *forkhead Box O* (FOXO) e sua translocação para o núcleo de células mesenquimais. Nessa organela, a FOXO pode se ligar a uma proteína que aumenta sua atividade, conhecida como β -catenina, que também possui afinidade pelo fator de transcrição fator-celular T (TCF), proporcionando um quadro de competição (ESSERS *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2007). Com isso, há redução da atividade da TCF, que está relacionada à diferenciação de células não-miogênicas em células miogênicas, através do aumento da expressão de fatores transcripcionais como MyoD e MYF5 (HECHT & KEMLER, 2000; TONG *et al.*, 2009). Em concordância com esse efeito, um experimento envolvendo ovelhas prenhes observou redução da miogênese fetal em um modelo de obesidade e inflamação maternas (TONG *et al.*, 2009).

No trabalho de Bayol *et al.* (2005) foi estudado o efeito do consumo de dieta de cafeteria, composta por alimentos ricos em ácidos graxos saturados e em carboidratos simples, por ratas durante a gestação e a lactação, no desenvolvimento muscular, e na expressão de proteínas que compõem mecanismos anabólicos no músculo das ninhadas no desmame. Os autores detectaram redução no número e na área da secção transversa das fibras musculares em animais alimentados com a ração hiperlipídica na gestação e na lactação. Esses animais também apresentaram desordens metabólicas, como aumento da expressão de IGF-I e de seu receptor, redução na transcrição de RNAm de GLUT4 e aumento da deposição de gordura intramuscular, quadros comuns na redução da sensibilidade à insulina.

Novamente, o desenvolvimento muscular demonstra relação com a resistência à insulina. O acúmulo de gordura intramuscular – marcador de redução no desenvolvimento do tecido muscular esquelético – pode ocorrer

como uma tentativa de reverter o quadro de baixa sensibilidade à insulina, através da ativação do fator de transcrição *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR- γ) que favorece a síntese de lipídeos.

Nesse contexto, o estudo de Zhu *et al.* (2008) demonstrou que a obesidade materna provoca redução na atividade do mTOR, com concomitante redução na fosforilação da 4E-BP1 e aumento da fosforilação do complexo inibidor de sua atividade, TSC1/TSC2, no músculo esquelético de fetos de ovelhas submetidas ao *overfeeding*. É proposto que, no modelo utilizado para a indução da obesidade, as alterações na atividade do mTOR apresentem relação com a atividade da AMPK e com as concentrações aumentadas de TNF- α .

Curiosamente, neste mesmo estudo, a prole dos animais submetidos ao *overfeeding* não apresentou redução no desenvolvimento esquelético, avaliado pela razão entre miofibras secundárias e primárias – apesar da reduzida densidade de fibras musculares. Ademais, o peso dos músculos semitendinosos desses animais foi maior do que o identificado nos animais que compunham o grupo controle (ZHU *et al.*, 2008). Modelos de indução de obesidade por dietas hiperlipídicas durante o período fetal demonstraram, ainda, possível aumento da expressão de IGF-2, importante hormônio relacionado ao desenvolvimento fetal, efeito que é mantido até a vida adulta dos animais (ZHANG *et al.*, 2009).

Com estes dados conflitantes, cria-se um paradoxo, no qual dietas baseadas nos padrões ocidentais e o *overfeeding* parecem reduzir a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos com concomitante redução da atividade da via do mTOR, mas o consumo de dietas hiperlipídicas administradas no mesmo período pode aumentar a atividade de um fator de crescimento que, potencialmente, poderia provocar a manutenção do desenvolvimento muscular esquelético.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Condições experimentais

4.1.1 Animais

Para o presente estudo, foram utilizadas ratas albinas *Wistar* primíparas, obtidas de colônias de produção e de experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Selecionaram-se apenas as ratas com massa corporal entre 200 e 250 g. Os animais foram mantidos em gaiolas de criação até o 60º dia de vida e então transferidos para caixas de polipropileno coletivas (dimensões de 30x18x13 cm) nas quais ficaram até o início do experimento, momento no qual foram alocados individualmente. Durante todo o período experimental, os animais foram submetidos a condições ambientais que incluíam: temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de 55 ± 10 % e ciclo de iluminação 12h claro/12h escuro.

Todos os procedimentos realizados com os ratos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro sobre Experimentação Animal.

4.1.2 Acasalamento

Para o acasalamento, as ratas foram colocadas em caixas anteriormente ocupadas por machos e mantidas ali por dois dias, procedimento adotado com o intuito de estimular a ovulação. Posteriormente, o macho foi recolocado na caixa e os animais tiveram dois dias para se acasalarem.

O acasalamento realizado foi monogâmico (1 fêmea e 1 macho) e a cópula foi confirmada pela constatação da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal no período matutino (9 h). Uma vez detectadas as células germinativas do macho, a fêmea foi separada em uma caixa individual, sendo este considerado o primeiro dia de gestação.

4.1.3 Rações

As rações utilizadas no estudo foram preparadas nas dependências do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e seguiram as recomendações do *American Institute of Nutrition* para roedores na gestação e no crescimento (AIN-93G) (REEVES *et al.*, 1993).

4.1.3.1 Dieta controle

A ração controle foi preparada como uma mistura em pó, posteriormente peletizada, preparada de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (1993) para ratos em crescimento (AIN-93G) (REEVES *et al.*, 1993). O conteúdo de macronutrientes na dieta foi de 62,95 g/100 g de carboidratos, 17,34 g/100 g de proteínas e 7,00 g/100 g de lipídeos, representando 384,60 kcal/100 g.

4.1.3.2 Dieta hiperlipídica

A ração hiperlipídica correspondeu à formulação adaptada da AIN-93G, preparada com substituição de 330 g de amido de milho por gordura suína em relação à dieta controle. A textura dessa dieta não permitiu a sua peletização. O conteúdo de macronutrientes na dieta foi de 29,95 g/100 g de carboidratos, 17,34 g/100 g de proteínas e 40 g/100 g de lipídeos, representando 549,16 kcal/100 g.

Tabela 1. Formulação das rações experimentais

| Componentes | Controle | Hiperlipídica |
|----------------------------|-----------------|----------------------|
| Amido de milho (g) | 529,49 | 199,49 |
| Caseína (g) | 200 | 200 |
| Sacarose (g) | 100 | 100 |
| Óleo de soja (g) | 70 | 70 |
| Gordura suína (g) | | 330 |
| Mistura salina (g) | 35 | 35 |
| Mistura vitamínica (g) | 10 | 10 |
| Celulose (g) | 50 | 50 |
| L-Cistina (g) | 3 | 3 |
| Bitartarato de colina (g) | 2,5 | 2,5 |
| Tetra-butilidroquinona (g) | 0,014 | 0,014 |
| Oferta energética (kcal)/g | 3,84 | 5,49 |
| TOTAL (g) | 1.000 | 1.000 |

4.1.4 Manipulação dos animais, determinação do peso corporal e do consumo de ração

Toda a manipulação dos animais foi realizada em horário fixo, com início entre 9 e 10 h.

Os animais foram pesados 3 vezes por semana em balança com precisão de 0,1 g (Marte AL 5000). Nessas ocasiões, a ração foi providenciada e o consumo do período foi determinado. Para a avaliação do consumo de ração, foi calculada a diferença entre a quantidade de ração colocada anteriormente e a restante, considerando-se o montante desperdiçado. Toda a ração desperdiçada foi minuciosamente separada e pesada, utilizando-se

balança com precisão de 0,01 g (Marte AL 5000). A água dos bebedouros foi esterilizada em autoclave e trocada 3 vezes por semana.

4.1.5 Desenho experimental e grupos experimentais

Dez dias antes do acasalamento, as ratas foram distribuídas em dois grupos com peso semelhante de acordo com a dieta oferecida:

- Dieta controle (CON n=19)
- Dieta hiperlipídica (HL n=20)

As rações e a água foram fornecidas *ad libitum*.

Uma vez prenhes, os animais foram pesados e dispostos em gaiolas plásticas, recebendo suas respectivas dietas durante toda a gestação e a lactação. Assim que os filhotes nasceram (23 a 24 dias após o acasalamento), avaliou-se o tamanho da ninhada por contagem e determinou-se o sexo dos animais, mediante a avaliação da distância anogenital. Seis animais de cada matriz foram eutanasiados no nascimento e outros seis foram selecionados para dar continuidade ao estudo, sendo, sempre que possível, respeitada a proporção de três machos e três fêmeas. Os filhotes participantes dessa segunda etapa foram amamentados por 21 dias – o que corresponde ao período normal de lactação em ratos – e, então, eutanasiados.

A seleção de animais para as diferentes fases do estudo teve como base a escolha de filhotes cuja média de peso ao nascer fosse semelhante entre as duas etapas. Cabe ressaltar que a escolha por seis animais para a amamentação buscou garantir condições ideais de amamentação, com consequente redução do risco de desnutrição das crias (GUO & JEN, 1995; ZHANG *et al.*, 2009).

4.1.5.1 Nascimento

As matrizes foram monitoradas frequentemente no período final de gestação. Após o nascimento do primeiro filhote, aguardaram-se 120 minutos para a coleta da ninhada e seleção dos animais participantes das duas etapas do estudo. O período de 120 minutos foi escolhido com base em um estudo prévio e corresponde ao tempo suficiente para o nascimento de todos os

animais sem que haja amamentação. Os filhotes foram então pesados e cerca de seis animais por mãe foram eutanasiados para coleta das amostras.

4.1.5.2 Desmame

Os filhotes selecionados para participar da etapa de lactação (6 por ninhada) foram dispostos junto das mães que, por sua vez, foram distribuídas em outros quatro grupos, segundo a dieta que receberam no período gestacional e até o final do período de amamentação:

- Dieta controle/Dieta controle (CON/CON n=9)
- Dieta controle/Dieta hiperlipídica (CON/HL n=10)
- Dieta hiperlipídica/Dieta hiperlipídica (HL/HL n=13)
- Dieta hiperlipídica/Dieta controle (HL/CON n=7)

No entanto, nos grupos CON/CON e HL/HL ocorreu o óbito de uma matriz, por causas desconhecidas. Nos grupos que consumiram a ração hiperlipídica no período pós-gestacional (CON/HL e HL/HL), observou-se o canibalismo de filhotes em uma e em quatro ninhadas, respectivamente. As ninhadas nas quais ocorreu o canibalismo foram prontamente excluídas.

Ao final da lactação (21 dias), tanto as mães quanto os filhotes foram eutanasiados e as amostras coletadas para análise.

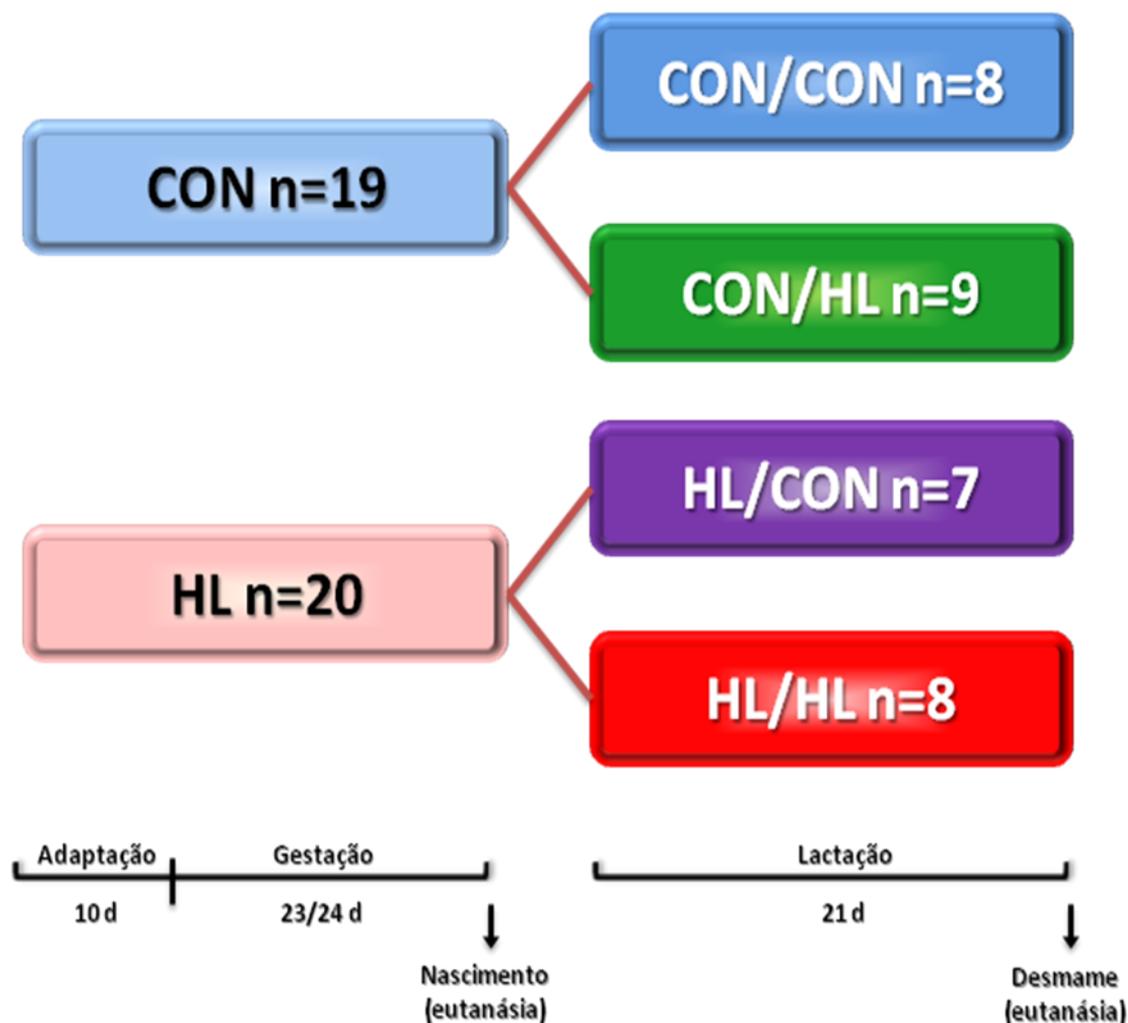


Figura 3. Desenho experimental.

CON: Grupo alimentado com ração controle no período gestacional. HL: Grupo alimentado com ração hiperlipídica no período gestacional. CON/CON: Grupo alimentado com ração controle nos períodos gestacional e pós-gestacional. HL/HL: Grupo alimentado com ração hiperlipídica nos períodos gestacional e pós-gestacional. CON/HL: Grupo alimentado com ração controle até o nascimento e com dieta hiperlipídica durante o período pós-gestacional. HL/CON: Grupo alimentado com dieta hiperlipídica durante a gestação e com dieta controle no período pós-gestacional.

4.1.6 Eutanásia

4.1.6.1 Nascimento

Os animais neonatos foram anestesiados com cerca 10 µl de coquetel para roedores (1/1/0,4/1,6 v/v) de cloridrato de xilazina (20 mg/mL), cloridrato de quetamina (100 mg/mL), acepromazina (20 mg/mL) e água destilada, aplicado por meio de seringa e agulha por via intraperitoneal. Quando constatado que o animal não apresentava mais reflexo, o sangue foi coletado do plexo axilar e mantido à temperatura ambiente até o término da sessão de

eutanásia. O sangue foi, então, centrifugado [(Jouan BR4i) 4 °C, 3.000 rpm, 15 minutos] e, do soro coletado, fez-se um *pool* que compreendia as amostras de animais da mesma ninhada. Esse *pool* foi separado para as análises de concentração sérica de proteínas totais, de glicose, de colesterol total, de triacilgliceróis, de insulina, de leptina, do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e do fator de necrose tumoral *alpha* (TNF- α). O soro foi mantido em microtubos do tipo *ependorf* no gelo e, posteriormente, as amostras foram separadas em alíquotas e acondicionadas em *freezer* (-80 °C).

Em seguida, os animais tiveram os músculos gastrocnêmios de ambas as patas, bem como o fígado, rapidamente dissecados e pesados em balança analítica com precisão de 0,0001g (Ohaus). O músculo da pata direita foi imerso em nitrogênio líquido e, posteriormente à sessão de eutanásia, homogeneizado em tampão de extração de proteínas com o auxílio de um homogeneizador elétrico (Ika T10 basic), sendo o material solúvel alíquotado e armazenado em *freezer* (-80 °C) para a quantificação da expressão e da fosforilação de proteínas de interesse por *Western Blotting*. O músculo da pata esquerda e duas amostras de fígado retiradas de uma região padronizada do lobo esquerdo foram armazenados em tubos de criogenia e acondicionados em *freezer* (-80 °C) para posteriores análises. O restante do fígado foi descartado.

Após a retirada e o congelamento dos músculos e das amostras do fígado, foi também dissecado e pesado o coração. O trato digestório foi retirado, totalmente esvaziado, lavado com soro fisiológico e, juntamente com o restante dos órgãos, devolvido à carcaça.

Nesse momento, a carcaça foi pesada em balança analítica com precisão de 0,01 g (Marte AL 5000) e congelada em *freezer* (-20 °C) para posterior análise da composição química. Cabe ressaltar que, entre a eutanásia e o congelamento dos tecidos de cada animal, transcorreram-se cerca de 5 minutos.

4.1.6.2 Desmame

Para a eutanásia dos filhotes lactantes, foram excluídos os animais que apresentavam maior e menor massa corporal no penúltimo dia de vida, no intuito de tornar os grupos mais homogêneos. Para todas as análises séricas e moleculares realizadas nos ratos com 21 dias de vida, amostras foram coletadas de animais em dois períodos específicos. Uma vez que parte dos animais foi retirada de suas mães durante a mamada que ocorria no período da manhã, consideramos o período da primeira coleta como sendo pós-prandial. Em relação à segunda coleta, consideramos os 90 minutos de espera como período de jejum, levando em consideração a taxa metabólica basal acelerada dos animais em lactação.

Inicialmente, foram separados dois subgrupos compostos por dois animais cada, escolhidos aleatoriamente. Ambos foram retirados das matrizes durante a amamentação entre 9h e 9h 30min, sendo que os animais do primeiro subgrupo foram pesados em balança com precisão de 0,1 g (Marte AL 5000) e eutanasiados imediatamente por decapitação com guilhotina. Os animais do segundo subgrupo, composto pelos dois filhotes restantes, foram retirados das mães, dispostos em uma caixa plástica separada e mantidos em jejum por, exatamente, 90 minutos. Ao final desse período, os animais foram pesados e eutanasiados por decapitação. O sangue foi coletado em um microtubo de polipropileno, centrifugado (4 °C, 3.000 rpm, 15 minutos) e o soro resultante foi separado para as análises das concentrações séricas de proteínas totais, de glicose, de colesterol total, de triacilgliceróis, de insulina, de leptina, do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e do fator de necrose tumoral *alpha* (TNF- α).

Em seguida, os animais tiveram órgãos e tecidos dissecados e pesados em balança analítica com precisão de 0,0001 g (Ohaus): coração, fígado, tecidos adiposos brancos subcutâneo (SUB) e retroperitoneal (RET) e músculos gastrocnêmios e sóleos de ambas as patas. Depois de pesados, o músculo sóleo da pata direita de cada animal foi rapidamente imerso em nitrogênio líquido e ali mantido até o final da sessão de eutanásia, momento em que foi homogeneizado em tampão de extração de proteínas e o material solúvel armazenado em *freezer* (-80 °C), para a quantificação da expressão e

da fosforilação de proteínas de interesse por *Western Blotting*. O músculo sóleo da pata esquerda e os coxins adiposos subcutâneo e epididimal foram imersos em nitrogênio líquido e acondicionados em tubos de criogenia alocados em *freezer* (-80 °C).

O músculo gastrocnêmio da pata direita foi fixado em cortiça com *tissue tec* e talco, de modo que a porção proximal ficasse exposta. Após esse procedimento, os músculos fixados foram armazenados em nitrogênio líquido para análise morfométrica. O músculo gastrocnêmio da pata esquerda e o fígado dos animais foram imersos em nitrogênio líquido e embrulhados em lâminas de papel alumínio previamente identificadas, para futuras análises.

Os animais tiveram o trato digestório totalmente esvaziado e lavado com soro fisiológico. Coração, estômago, intestino, rins e tecido adiposo branco retroperitoneal foram devolvidos à carcaça para a determinação da composição química. Nesse momento, a carcaça foi pesada em balança analítica com precisão de 0,01 g (Marte AL 5000) e congelada em *freezer* (-20 °C), para posterior análise da composição química.

Também nessa etapa, transcorreram-se, entre a eutanásia e o congelamento dos tecidos, cerca de 5 minutos.

4.2 Análises

4.2.1 Avaliação da composição corporal

A avaliação da composição corporal dos animais foi realizada por meio da análise química da carcaça, para a determinação do conteúdo de lipídeos, de proteínas e de umidade. A carcaça é constituída de todo o corpo do animal, com exceção da amostra de sangue, dos músculos gastrocnêmios e do fígado, para os animais participantes da etapa I, e da amostra de sangue, dos músculos gastrocnêmios e sóleos, do fígado e dos tecidos adiposos brancos epididimal e subcutâneo, para os animais participantes da etapa II. A determinação foi feita segundo metodologia descrita por Donato *et al.* (2007) e encontra-se reproduzida abaixo.

4.2.1.1 Umidade

O conteúdo de umidade foi determinado por secagem da carcaça em estufa ventilada (aproximadamente 70 °C) durante sete dias. O conteúdo de umidade presente na carcaça foi determinado pela diferença entre os valores obtidos na pesagem da carcaça antes e após a secagem da mesma.

4.2.1.2 Lipídeos

Toda a carcaça seca foi envolvida por papel filtro (Whatman) e, por meio da técnica de extração com éter etílico (Synth) como solvente, removeu-se todo o lipídeo, utilizando-se o extrator de Soxhlet.

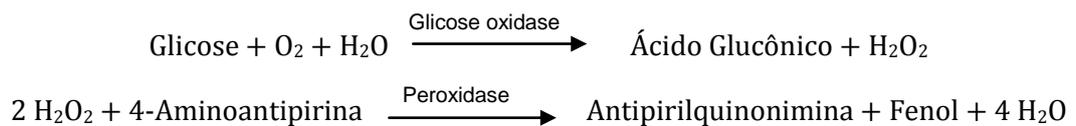
A extração foi mantida por dois dias e, ao final do procedimento, o solvente foi recuperado e os balões pesados. A diferença entre o peso do balão limpo, previamente determinado, e do balão com lipídeos forneceu o valor absoluto de gordura presente em toda a carcaça do animal. O percentual de gordura corporal foi calculado dividindo-se a quantidade de gordura da carcaça pelo peso corporal final, conforme a fórmula:

$$\% \text{ gordura corporal} = \frac{\text{gordura absoluta (g)}}{\text{peso corporal final (g)}} \times 100$$

4.2.5 Marcadores séricos

4.2.5.1 Glicose

Para a determinação da concentração sérica de glicose, utilizou-se um *kit* comercial (LabTest – Glicose PAP) para a aquisição dos reagentes usados nas reações e seguiu-se o método determinado por Bergmeyer (1974), que consiste nas seguintes reações:



O peróxido de hidrogênio formado na oxidação da glicose reage com 4-Aminoantipirina e fenol em reação catalisada pela peroxidase, formando antipirilquinonimina, cuja coloração vermelha tem intensidade proporcional à concentração de glicose da amostra.

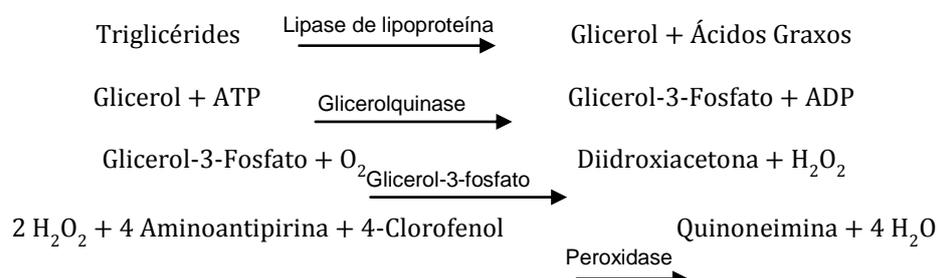
O procedimento seguiu a indicação do fabricante e a absorbância do produto final foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu UVmini-1240) em comprimento de onda de 505 nm. O aparelho foi previamente zerado com um branco e a concentração de glicose foi calculada a partir dos resultados de absorbância dos testes e do padrão, segundo a fórmula:

$$\text{Glicose (mg/dl)} = \frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância do padrão}} \times 100$$

Os testes para determinação de glicose foram realizados em duplicata.

4.2.5.2 Triacilgliceróis

Para a determinação da concentração sérica de triacilgliceróis, utilizou-se um *kit* colorimétrico comercial (LabTest – Triglicérides Liquiform). Seguindo as recomendações do fabricante, ocorreram as seguintes reações:



A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triacilgliceróis da amostra.

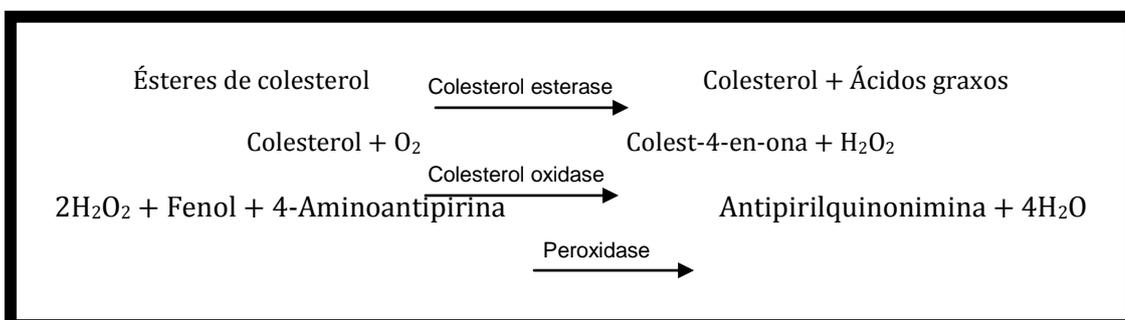
O procedimento seguiu a indicação do fabricante e a absorbância do produto final foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu UVmini-1240) em comprimento de onda de 505 nm. O aparelho foi previamente zerado com um branco e a concentração de triacilgliceróis foi calculada a partir dos resultados de absorbância dos testes e do padrão, segundo a fórmula:

$$\text{Triacilgliceróis (mg/dl)} = \frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância do padrão}} \times 100$$

Os testes para a determinação de triacilgliceróis foram realizados em duplicata.

4.2.5.3 Colesterol total

Para a determinação da concentração sérica de colesterol, utilizou-se um *kit* colorimétrico comercial (LabTest – Triglicérides Liquiform). Seguindo as recomendações do fabricante, ocorreram as seguintes reações:



O peróxido de hidrogênio formado na oxidação do colesterol reage com 4-Aminoantipirina e fenol em reação catalisada pela peroxidase, formando antipirilquinonimina, cuja coloração vermelha tem intensidade proporcional à concentração de glicose da amostra.

O procedimento seguiu a indicação do fabricante e a absorbância do produto final foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu UVmini-1240) em comprimento de onda de 500 nm. O aparelho foi previamente zerado com um

branco e a concentração de colesterol foi calculada a partir dos resultados de absorvância dos testes e do padrão, segundo a fórmula:

$$\text{Colesterol (mg/dl)} = \frac{\text{absorvância do teste}}{\text{absorvância do padrão}} \times 100$$

Os testes para a determinação de colesterol foram realizados em duplicata.

4.2.5.4 Proteínas totais

Para a determinação da concentração sérica de proteínas totais, foi utilizado um *kit* colorimétrico comercial (LabTest – Proteínas totais) para aquisição dos reagentes usados nas reações.

Os íons cobre (Cu^{+2}) em meio alcalino (Reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, que tem absorvância máxima em 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra.

O procedimento seguiu a indicação do fabricante e a absorvância do produto final foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu UVmini-1240) em comprimento de onda de 545 nm. O aparelho foi previamente zerado com um branco e a concentração de proteínas totais foi calculada a partir dos resultados de absorvância dos testes e do padrão, segundo a fórmula:

$$\text{Proteínas totais (mg/dl)} = \frac{\text{absorvância do teste}}{\text{absorvância do padrão}} \times 100$$

4.2.5.5 Insulina, TNF- α , leptina e IGF-1

As dosagens foram realizadas pelo método imunoensaio multiplex, utilizando *kit rat serum adipokine panel 2 LINCOplex*, para dosagem simultânea de insulina, de TNF- α e de leptina, e *kit rat serum IGF-1 LINCOplex Singleplex*, para a dosagem da concentração sérica de IGF-1, ambos produzidos pela LINCO Research (EUA). As determinações foram feitas em equipamento automático Lincoplex 200.

Os *kits LINCOplex* utilizam a tecnologia *Multiple Analyte Profiling* (xMAP™), que compreende processo de coloração interna de microesferas de poliestireno com dois fluorocromos espectrais distintos. Utilizando uma proporção precisa destes dois fluorocromos, foram criados conjuntos de esferas, cada uma com sua individualização baseada em um código de cor. Cada esfera é conjugada a um anticorpo analito-específico e é lida em equipamento Lincoplex 200, através de sistema duplo de *lasers* que incide enquanto ela flui através do fluxo celular. Um feixe de *laser* detecta a microesfera (com um código de cor específico para o ensaio), enquanto o outro *laser* quantifica o sinal de repórter.

As dosagens foram realizadas nas dependências do Laboratório de Análises Clínicas da empresa Gênese Produtos Farmacêuticos e Diagnósticos Ltda – São Paulo (SP).

4.2.6 Análise morfométrica do músculo esquelético

Inicialmente, os tecidos tiveram entre 1.500 e 2.000 μm de sua porção proximal desbastada em criostato a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, removendo a sua região superficial, rica em artefatos, os quais poderiam prejudicar as análises histológicas.

Cortes de 6 μm foram coletados em lâmina de vidro previamente higienizada em álcool 70 % e preparada com poli-L-lisina. Em seguida, esses primeiros cortes foram rapidamente corados com azul de metileno e analisados em microscópio ótico de uso diário, com aproximações de 100 e 1.000 x para avaliação da qualidade do corte. Uma vez que os cortes apresentavam-se adequados (com fibras transversais, células conservadas e ausência de artefatos), foram feitos de 4 a 5 cortes por lâmina, no total de oito lâminas por amostra. Após o preparo de todas as lâminas, estas foram embrulhadas em

plástico filme e armazenadas em *freezer* (-80 °C).

Todos os procedimentos descritos foram realizados dentro do criostato, evitando-se a degradação celular.

Para avaliação morfométrica da secção transversa do músculo gastrocnêmio, o tecido foi corado com hematoxilina e eosina, sendo as lâminas observadas em microscópio ligado a um sistema de digitalização de imagem (*Leica Imaging Systems*). As imagens digitalizadas dos músculos foram analisadas através do programa *Image-Pro PLUS™* 3.0.01.

Os cortes histológicos e o preparo das lâminas foram realizados nas dependências do Laboratório do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP. A captação das imagens ocorreu no Laboratório de Biologia Molecular da Escola de Educação Física e Esporte da USP.

4.2.7 Western Blotting

4.2.7.1 Extração de proteínas

Inicialmente, o músculo sóleo dissecado foi pesado e imerso em nitrogênio líquido por cerca de dez segundos. Posteriormente, foi mantido em tubos criogênicos até a extração.

O tecido foi, então, homogeneizado em tampão de extração contendo 50 mM tampão fosfato de potássio (pH 7,00), 0,3 M sacarose, 0,5 mM DL-ditiotreitol, 1 mM EDTA (pH 8,00), 0,3 mM PMSF, 10 mM NaF, 1:100 *Phosphatase Inhibitor Cocktail 1* (Sigma-Aldrich), 1:100 *Phosphatase Inhibitor Cocktail 2* (Sigma-Aldrich), 1:100 *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich). Para a homogeneização foi usado homogeneizador elétrico tipo *polytron* (Ika T10 basic) na velocidade máxima, em 3 *bursts* de cerca de 10 segundos cada. A velocidade elevada foi utilizada para dissociar e romper as células musculares. Entre a homogeneização de diferentes amostras, o homogeneizador foi lavado em álcool 70 % e água ultrapura. Durante todo o processo de homogeneização, os tubos contendo as amostras foram mantidos no gelo, no intuito de reduzir a atividade de fosfatases e enzimas proteolíticas.

As amostras foram, então, centrifugadas por 20 minutos a 12.000 rpm e temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante, que foi transferido para outro tubo, aliquoteado e armazenado em *freezer* (-80 °C).

4.2.7.2 Determinação das concentrações de proteína nos lisados

A concentração de proteínas do homogenado foi determinada através de um *kit* comercial (*BCA Protein Assay kit – Pierce*), que forneceu os reagentes para o ensaio, no qual seguiu-se protocolo recomendado pelo fabricante.

4.2.7.3 Preparo do gel de poliacrilamida

Inicialmente, foram preparados géis em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5 %, 125 mM Tris (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % persulfato de amônia e 0,1 % TEMED. Os géis inferiores (resolutivos) foram preparados com poliacrilamida nas concentrações de 7,5 e 10 %, 380 mM Tris (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônia e 0,077 % TEMED.

4.2.7.4 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE

As amostras foram combinadas com tampão de amostra contendo 240 mM Tris, (pH 6,8), 40 % glicerol, 0,8 % SDS, 200 mM beta-mercaptoetanol e 0,02 % azul de bromofenol. Amostras contendo 25 µg de proteína foram submetidas à eletroforese no gel de poliacrilamida, inicialmente a 60 V. Uma vez que as proteínas atravessaram o gel de empilhamento, a voltagem foi aumentada para 120 V, sendo mantida até o final da corrida

4.2.7.5 Transferência de proteínas do gel para a membrana

O gel contendo as proteínas fracionadas por eletroforese foi incubado por 10 min em tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS, 20 % metanol, pH 8,3). Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada e, então, incubada em tampão de transferência. Um "sanduíche" foi montado, na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel filtro de 3 mm, gel, membrana, 2 folhas de papel de filtro de 3 mm (Whatman) e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência, sob corrente de 25 V,

por 90 min. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana, por 5 min, com corante Ponceau (1 % ponceau, 1 % ácido acético), seguida de lavagem com PBST [8 % NaCl, 0,2 % KCl, 0,2 % $\text{KH}_2(\text{PO})_4$, 1,15 % $\text{Na}_2\text{H}(\text{PO})_4$, 0,5 % Tween].

4.2.7.6 Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de albumina bovina a 5 %, em tampão PBST, por 60 min, sob agitação. O anticorpo específico para cada proteína de interesse foi diluído [1:250 para phospho-p70 S6K(Thr389) e phospho-AKT1(Ser473), 1:500 phospho-mTOR(Ser2448); 1:1000 para mTOR, phospho-4E-BP1(Thr70), AKT1, p70 S6K e 4E-BP1] em PBST e utilizado para a incubação das membranas *overnight*, sob agitação em geladeira a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, por 5 min, com PBST e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:3.000 em PBST, por 1 h, sob agitação em geladeira. A membrana foi lavada 3 vezes, por 5 min, com agitação.

4.2.7.7 Revelação com sistema quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura de volumes iguais dos reagentes 1 e 2 do *kit ECL Advance* (GE Healthcare), composto por luminol, fenol e peróxido de hidrogênio, sendo a mistura utilizada para umedecer as membranas. Os *blots* foram visualizados por um sistema de bioimagem ImageQuant™ 400 (GE Healthcare), que capturou imagens por 7 minutos, e analisados pelo *software* ImageQuant TL (GE Healthcare).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão. Os dados foram previamente submetidos ao teste de homogeneidade das variâncias (testes de Cochran C, Hartley, Bartlett). Na comparação entre os dois grupos de animais neonatos, utilizou-se o teste de *t-Student*. As comparações entre os grupos de animais com 21 dias de idade foram avaliadas pela análise de variância fatorial (ANOVA fatorial), seguida do teste de Tukey para identificação dos contrastes significantes em caso de interação entre os fatores estudados. Correlações entre diferentes marcadores foram avaliadas através de regressão linear. Para ambas as etapas e para todas as análises, adotou-se valor de significância de 0,05. A análise estatística foi realizada no *software* Statistica versão 7.0 (StatSoft, Inc, OK, EUA).

6. RESULTADOS

6.1 Consumo das rações

A figura 4 representa a média do consumo semanal das rações pelas matrizes dos grupos durante o período experimental. Observamos que, tanto na gestação quanto na lactação, houve variação no consumo absoluto das dietas entre os grupos. Nas primeiras duas semanas gestacionais, os grupos que consumiram ração hiperlipídica apresentaram menor consumo em relação aos demais. Entretanto, nota-se que, na terceira semana, o consumo dos grupos com dieta hiperlipídica foi significativamente maior apenas em relação ao grupo CON/HL (figura 4A).

Notamos também que os grupos com dieta HL pós-gestacional tiveram consumo significativamente reduzido quando comparados ao grupo CON/CON na primeira e na terceira semanas de lactação. Destaca-se, ainda nesses períodos, o menor consumo absoluto entre os animais pertencentes ao grupo CON/HL em relação aos do grupo reabilitado no desmame (HL/CON). Na segunda semana, apenas o grupo CON/HL teve consumo significativamente menor do que o apresentado pelo grupo CON/CON, sendo que esse comportamento não foi observado no grupo HL/HL (figura 4A).

Apesar das diferenças identificadas no consumo absoluto das rações, ao avaliarmos o consumo energético semanal, não detectamos contrastes estatisticamente significantes entre os grupos experimentais (figura 4B).

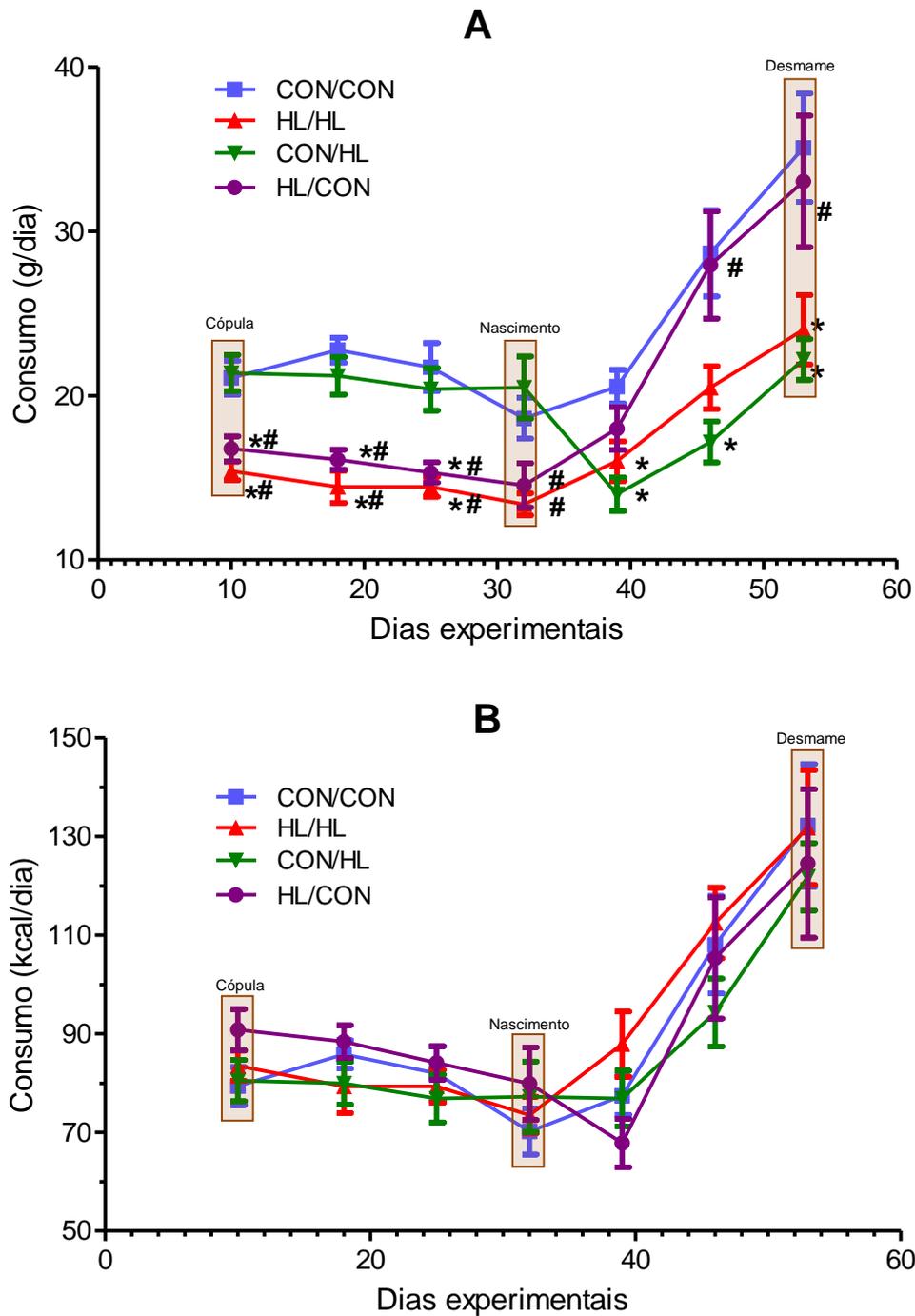


Figura 4. Consumo absoluto e energético das rações experimentais pelas matrizes durante o período de intervenção.

A figura A representa os resultados de consumo absoluto das rações experimentais. A figura B representa o consumo energético. Resultados são expressos como média \pm erro-padrão. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON/CON no período; # Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON/HL no período. As diferenças em cada período foram calculadas por ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey. CON/CON: Grupo alimentado com ração controle nos períodos gestacional e pós-gestacional. HL/HL: Grupo alimentado com ração hiperlipídica nos períodos gestacional e pós-gestacional. CON/HL: Grupo alimentado com ração controle durante a gestação e com ração hiperlipídica durante a lactação. HL/CON: Grupo alimentado com ração hiperlipídica durante a gestação e com ração controle durante a lactação.

6.2 Evolução ponderal

6.2.1 Evolução ponderal materna

De acordo com a figura 5, verificamos que, entre as matrizes dos grupos CON/CON, CON/HL, HL/CON e HL/HL, não havia diferença na massa corporal no início do experimento. Notamos ainda que, em relação ao ganho de peso gestacional e à evolução ponderal materna após o nascimento das ninhadas, não houve influência das dietas gestacional e pós-gestacional sobre a massa corporal das matrizes.

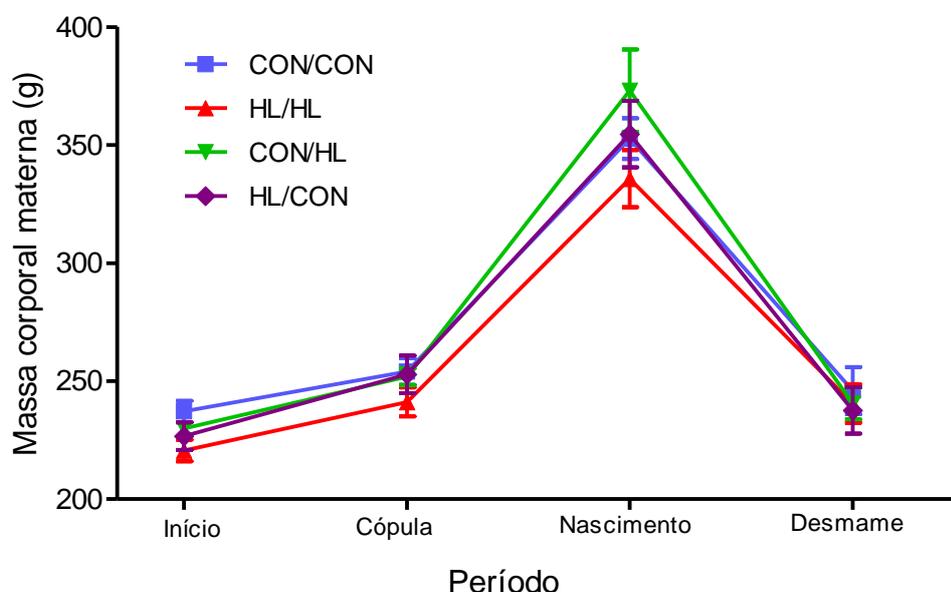


Figura 5. Evolução ponderal materna durante o período experimental.

Resultados são expressos como médias \pm erro-padrão. CON/CON: Grupo alimentado com ração controle nos períodos gestacional e pós-gestacional. HL/HL: Grupo alimentado com ração hiperlipídica nos períodos gestacional e pós-gestacional. CON/HL: Grupo alimentado com ração controle durante a gestação e com ração hiperlipídica durante a lactação. HL/CON: Grupo alimentado com ração hiperlipídica durante a gestação e com ração controle durante a lactação.

6.2.2 Evolução ponderal dos filhotes

A figura 6 representa a evolução da média do peso semanal individual dos filhotes no período que compreende o 1º e o 21º dias de vida, durante o

qual não foram detectadas variações significantes entre os animais dos quatro grupos experimentais.

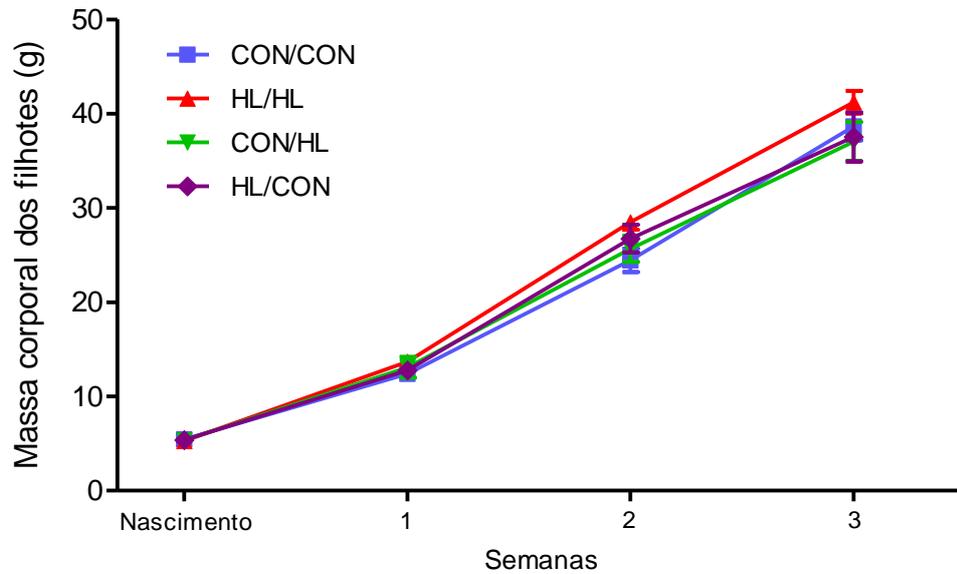


Figura 6. Evolução ponderal individual dos filhotes.

Resultados são expressos como médias \pm erro-padrão. CON/CON: Grupo alimentado com ração controle nos períodos gestacional e pós-gestacional. HL/HL: Grupo alimentado com ração hiperlipídica nos períodos gestacional e pós-gestacional. CON/HL: Grupo alimentado com ração controle durante a gestação e com ração hiperlipídica durante a lactação. HL/CON: Grupo alimentado com ração hiperlipídica durante a gestação e com ração controle durante a lactação.

6.3 Nascimento

6.3.1 Tamanho das proles, massa corporal e massa de órgãos

No nascimento, avaliaram-se o tamanho das proles por contagem e a massa corporal dos filhotes por gravimetria. Quanto ao número de filhotes e ao peso ao nascer, não houve diferença significativa entre os grupos (tabela 2). Com excessão do fígado, cuja massa absoluta foi menor no grupo HL, as massas dos órgãos e dos tecidos também não apresentaram diferença significativa e os resultados encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2: Tamanho da prole, massa corporal e massa de órgãos e tecidos dos filhotes no nascimento.

| | CON | HL | P |
|--------------------------------|--------------------|---------------------|--------------|
| Tamanho da prole (un) | 12,73 ± 0,45 | 12,29 ± 0,13 | 0,486 |
| Massa corporal (g) | 5,43 ± 0,06 | 5,28 ± 0,15 | 0,436 |
| Coração (mg) | 29,62 ± 1,07 | 28,24 ± 1,14 | 0,393 |
| Coração (g/100 g) | 0,55 ± 0,02 | 0,54 ± 0,02 | 0,744 |
| Fígado (mg) | 268,7 ± 9,4 | 245,3 ± 6,7* | 0,041 |
| Fígado (g/100 g) | 4,96 ± 0,09 | 4,62 ± 0,16 | 0,088 |
| Gastrocnêmio (mg) | 9,29 ± 0,59 | 10,08 ± 0,51 | 0,329 |
| Gastrocnêmio (mg/100 g) | 169,1 ± 10 | 187,9 ± 4,6 | 0,128 |

Resultados são expressos como média ± erro-padrão. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle com $P < 0,05$ calculado por *t* teste não pareado. CON: Grupo alimentado com ração controle no período gestacional. HL: Grupo alimentado com ração hiperlipídica no período gestacional.

6.3.2 Marcadores séricos

Na tabela 3, estão descritos os resultados das determinações séricas de triacilgliceróis, colesterol total, glicose, insulina, IGF-I, leptina, proteínas totais e TNF- α , referentes aos filhotes eutanasiados no nascimento.

Como é observável, existe redução significativa das concentrações séricas de leptina e IGF-I, em resposta ao consumo materno da dieta HL. Quanto às concentrações séricas dos demais analitos, não foi observado efeito do consumo da dieta hiperlipídica gestacional sobre os animais neonatos.

Tabela 3. Marcadores séricos referentes aos animais neonatos.

| | CON | HL | P |
|--|--------------------|----------------------|------------------|
| Glicose (mg/dl) | 81,97 ± 8 | 88,41 ± 11,1 | 0,635 |
| Insulina (ng/dl) | 1627 ± 94 | 2017 ± 202,2 | 0,143 |
| IGF-I (ng/dl) | 14880 ± 895 | 11860 ± 267* | 0,029 |
| Triacilgliceróis (mg/dl) | 42,07 ± 2,59 | 32,29 ± 4,82 | 0,178 |
| Colesterol total (mg/dl) | 42,63 ± 2,54 | 38,84 ± 1,65 | 0,218 |
| Leptina (ng/dl) | 1993 ± 101 | 1034 ± 138*** | <0,001 |
| Proteínas totais (mg/dl) | 1,32 ± 0,4 | 1,02 ± 0,19 | 0,493 |
| TNF-α (pg/dl) | 4,39 ± 0,29 | 4,53 ± 0,39 | 0,773 |

Resultados são expressos como médias ± erro-padrão. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle com $P < 0,05$ calculado por *t* teste não pareado; *** indica diferença estatística com $P < 0,001$. CON: Grupo alimentado com ração controle no período gestacional. HL: Grupo alimentado com ração hiperlipídica no período gestacional.

6.3.3 Western Blotting

6.3.3.1 Expressão e fosforilação da Akt

Na figura 7, estão representados os resultados, obtidos por *Western Blotting*, de expressão proteica e de fosforilação nos resíduos de treonina 308 e de treonina 473 da Akt, referentes ao músculo gastrocnêmio dos animais eutanasiados no nascimento. Podemos observar maior fosforilação da Akt em treonina 308, em resposta ao consumo materno gestacional da dieta hiperlipídica. No entanto, não houve efeito sobre a concentração da forma total da Akt e sobre a fosforilação em serina 473 no tecido estudado.

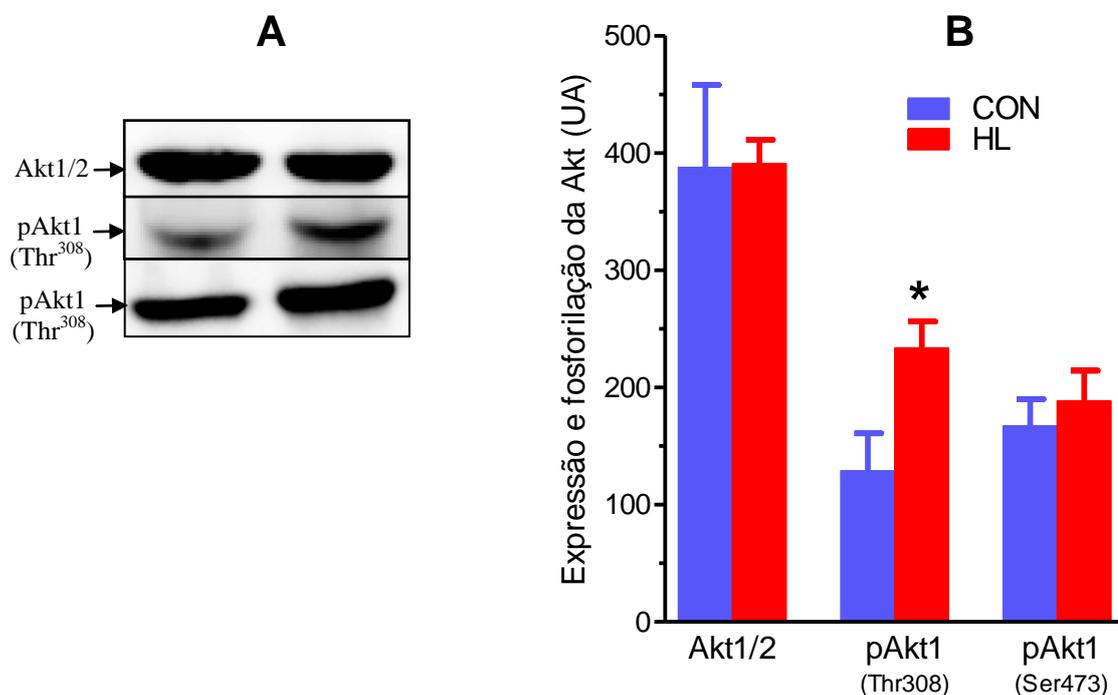


Figura 7. Expressão e fosforilação da Akt1 no músculo gastrocnêmio dos animais neonatos.

A figura A é composta por fotos representativas dos *blottings* referentes à expressão da Akt1/2 e à fosforilação da Akt1 em Thr308 e Ser473. A figura B representa os resultados obtidos. Resultados são expressos como média \pm erro-padrão. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle com $P < 0,05$ calculado por *t* teste não pareado. CON: Grupo alimentado com ração controle no período gestacional. HL: Grupo alimentado com ração hiperlipídica no período gestacional.

6.3.3.2 Expressão e fosforilação do mTOR

A partir da figura 8, observamos aumento da fosforilação do mTOR no resíduo de serina 2448 no músculo esquelético dos animais do grupo HL sem, no entanto, haver efeito da dieta sobre a expressão da proteína.

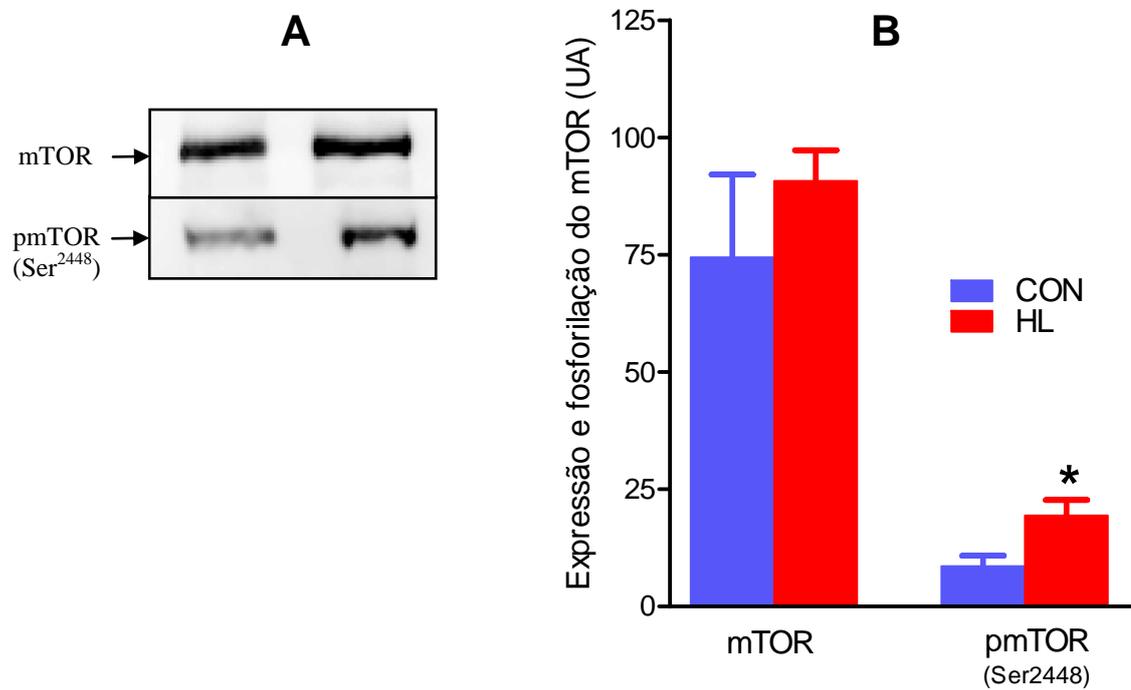


Figura 8. Expressão e fosforilação do mTOR no músculo gastrocnêmio dos animais neonatos.

A figura A é composta por fotos representativas dos *blottings* referentes à expressão e à fosforilação do mTOR em Ser2448. A figura B representa os resultados obtidos. Resultados são expressos em média \pm erro-padrão. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle com $P < 0,05$ calculado por *t* teste não pareado. CON: Grupo alimentado com ração controle no período gestacional. HL: Grupo alimentado com ração hiperlipídica no período gestacional.

6.3.3.3 Expressão e fosforilação da S6K1

Na figura 9 está representada a expressão da proteína S6K1, bem como a sua fosforilação no resíduo de treonina 389 no músculo esquelético dos animais recém-nascidos. Não há efeito da dieta gestacional sobre as concentrações, tanto de S6K1 quanto da sua forma fosforilada.

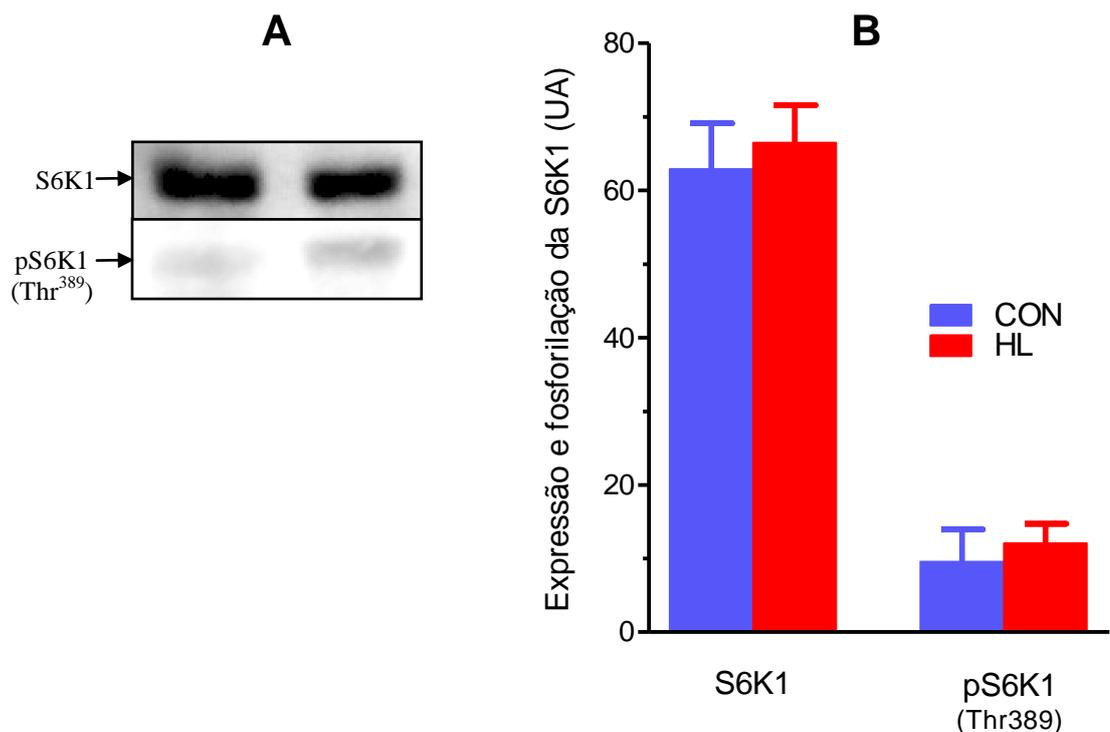


Figura 9. Expressão e fosforilação da S6K1 no músculo gastrocnêmio dos animais neonatos.

A figura A é composta por fotos representativas dos *blottings* referentes à expressão e à fosforilação da S6K1 em Thr389. A figura B representa os resultados obtidos. Resultados são expressos em média \pm erro-padrão. CON: Grupo alimentado com ração controle no período gestacional. HL: Grupo alimentado com ração hiperlipídica no período gestacional.

6.3.3.4 Expressão e fosforilação da 4E-BP1

A partir da figura 10, podemos observar que não houve efeito da dieta gestacional sobre a expressão da proteína 4E-BP1 no músculo esquelético dos neonatos. O padrão de migração dessa proteína em géis de acrilamida resulta na formação de três bandas distintas, denominadas *alpha*, *beta* e *gamma*, com cerca de 12, 15 e 20 kDa, respectivamente. Um eficiente método de avaliação da fosforilação dessa proteína ligante pelo seu efector *upstream*, mTOR, consiste na quantificação do percentual de fosforilação da forma migratória *gamma* em relação à soma das três (KIMBALL *et al.*, 2000; ESCOBAR *et al.*, 2006; 2010). No modelo estudado, a proporção de fosforilação da 4E-BP1 *gamma* no músculo gastrocnêmio não diferiu significativamente entre os animais eutanasiados ao nascer.

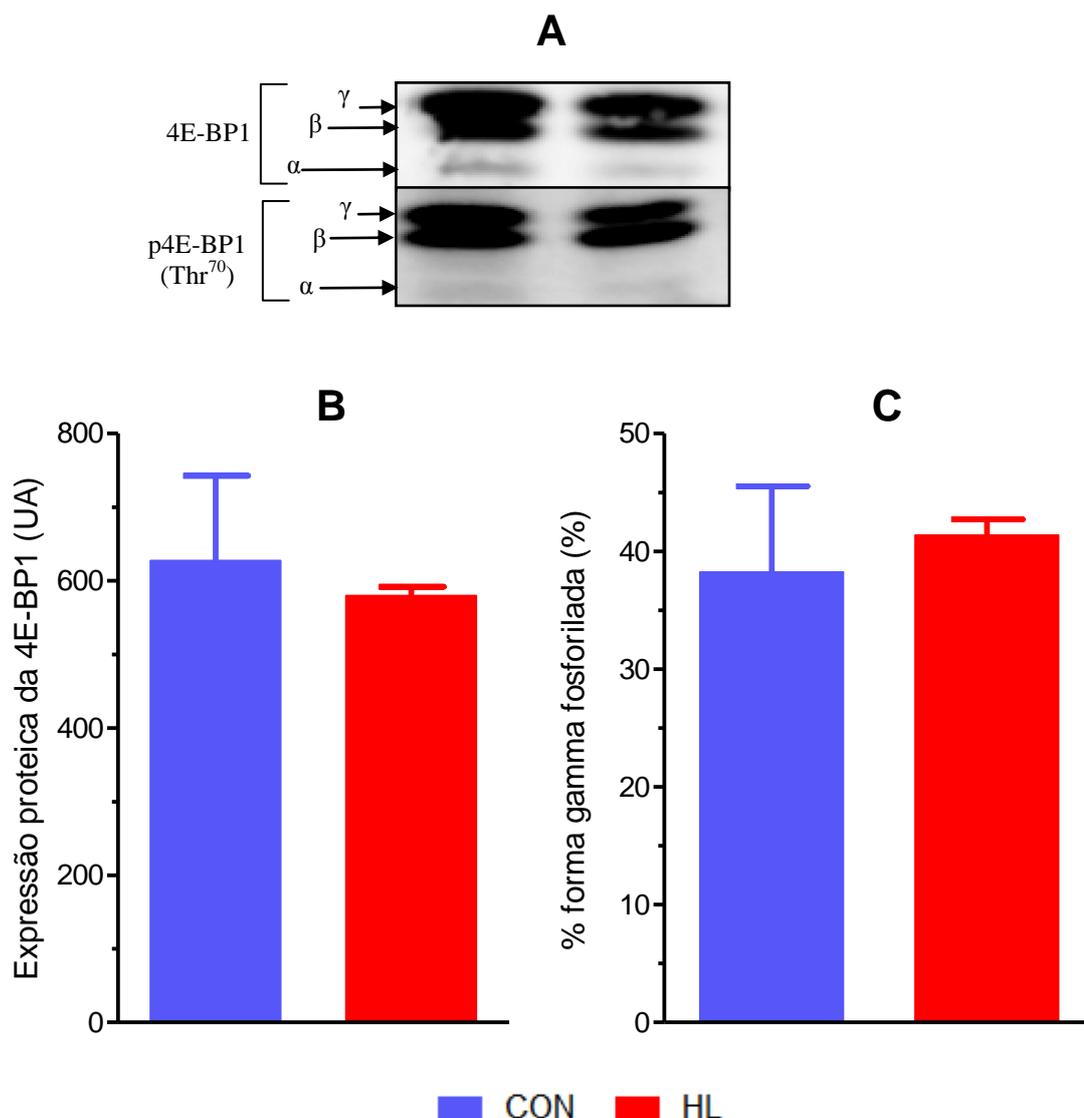


Figura 10. Expressão das diferentes subunidades e percentual de fosforilação da subunidade *gamma* da 4E-BP1 no músculo gastrocnêmio dos animais neonatos.

A figura A é composta por fotos representativas dos *blottings* referentes à expressão e à fosforilação em Thr70 das diferentes subunidades migratórias da 4E-BP1. A figura B representa os resultados de expressão proteica da 4E-BP1. A figura C representa os resultados de % da forma *gamma* fosforilada em relação à fosforilação total da 4E-BP1. Resultados são expressos em média \pm erro-padrão. CON: Grupo alimentado com ração controle no período gestacional. HL: Grupo alimentado com ração hiperlipídica no período gestacional.

6.3.4 Composição química da carcaça

A avaliação da composição corporal dos recém-nascidos foi realizada através das determinações de umidade, de adiposidade e de massa magra da carcaça. Como exposto na figura 11, podemos observar a ausência de efeito da dieta HL materna sobre esses marcadores.

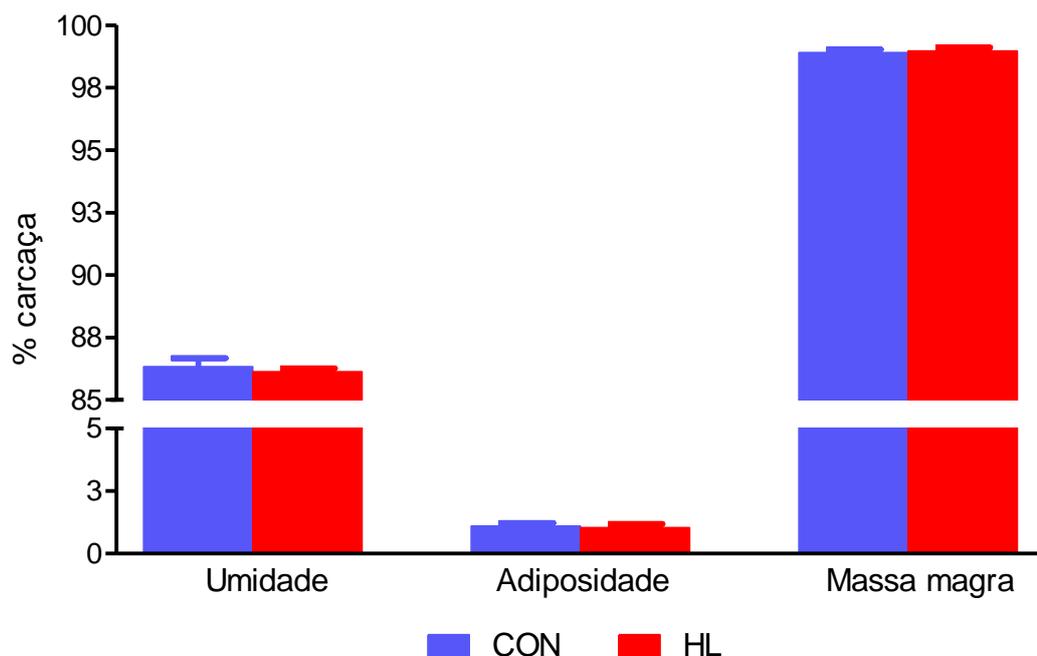


Figura 11. Composição química da carcaça dos animais neonatos.

Resultados são expressos em média \pm erro-padrão. CON: Grupo alimentado com ração controle no período gestacional. HL: Grupo alimentado com ração hiperlipídica no período gestacional.

6.4 Desmame

6.4.1 Massa corporal, massa de órgãos e de tecidos

Na tabela 4, estão descritos os resultados de massa corporal e de massa de órgãos, referentes aos filhotes, avaliados por gravimetria no dia do desmame. Observamos influência da dieta HL pós-gestacional sobre as massas dos músculos gastrocnêmio e sóleo e sobre a massa do fígado, relativas à massa corporal total.

Podemos notar que, em contraste ao reduzido desenvolvimento hepático e muscular, houve aumento do volume dos tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal em resposta à oferta da dieta hiperlipídica durante o período de amamentação (tabela 4)

Tabela 4. Massa corporal e massa de órgãos e de tecidos dos filhotes no desmame.

| | CON | | HL | | Influência dos fatores | | |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------|----------|
| | CON | HL | CON | HL | DG | DPG | DG x DPG |
| Massa corporal (g) | 37,94 ± 1,27 | 37,12 ± 1,83 | 38,23 ± 2,86 | 41,23 ± 1,19 | 0,23 | 0,549 | 0,296 |
| Coração (mg) | 236,67 ± 12,71 | 231,24 ± 15,99 | 242,51 ± 18,64 | 261,18 ± 4,91 | 0,265 | 0,677 | 0,45 |
| Coração (mg/100 g) | 622,38 ± 17,48 | 619,11 ± 15,02 | 611,67 ± 16,21 | 613,97 ± 3,38 | 0,628 | 0,976 | 0,865 |
| Fígado (g) | 1,49 ± 0,06 | 1,30 ± 0,09 | 1,59 ± 0,12 | 1,52 ± 0,05 | 0,069 | 0,136 | 0,476 |
| Fígado (g/100 g) | 3,92 ± 0,07 | 3,48 ± 0,10 | 4,02 ± 0,10 | 3,67 ± 0,08 | 0,112 | <0,001 | 0,636 |
| Gastrocnêmio (mg) | 125,95 ± 5,03 | 115,88 ± 8,44 | 125,42 ± 8,44 | 131,11 ± 8,12 | 0,349 | 0,779 | 0,316 |
| Gastrocnêmio (mg/100 g) | 329,82 ± 7,85 | 308,33 ± 12,9 | 340,35 ± 15,08 | 309,38 ± 11,58 | 0,636 | 0,039 | 0,698 |
| Sóleo (mg) | 12,18 ± 0,57 | 10,49 ± 0,82 | 12,13 ± 0,67 | 12,46 ± 0,55 | 0,168 | 0,32 | 0,148 |
| Sóleo (mg/100 g) | 32,03 ± 1,14 | 28,02 ± 1,08 | 31,66 ± 1,32 | 30,18 ± 1,14 | 0,451 | 0,027 | 0,290 |
| TA RET (mg) | 80,84 ± 14,53 | 105,31 ± 12,27 | 84,71 ± 20,13 | 126,36 ± 12,50 | 0,409 | 0,034 | 0,568 |
| TA RET (mg/100 g) | 209,14 ± 34,76 | 276,13 ± 24,77 | 171,26 ± 30,89 | 307,26 ± 30,26 | 0,914 | 0,003 | 0,273 |
| TA SUB (mg) | 374 ± 33,89 | 578,11 ± 70,31 | 432,03 ± 74,21 | 624,85 ± 45,20 | 0,4 | 0,003 | 0,927 |
| TA SUB (g/100 g) | 0,99 ± 0,07 | 1,54 ± 0,14 | 1,02 ± 0,15 | 1,52 ± 0,08 | 0,965 | <0,001 | 0,847 |

Resultados são expressos como média ± erro-padrão. Os valores de *P* para os fatores DG, DPG e DGxDPG foram calculados por ANOVA fatorial. Os resultados que apresentaram *P*<0,05 encontram-se em negrito. CON: controle. HF: hiperlipídica. DG: dieta gestacional (CON/CON, CON/HL) vs (HL/HL, HL/CON). DPG: dieta pós-gestacional (CON/CON, HL/CON) vs (CON/HL, HL/HL).

6.4.2 Composição corporal

Na figura 12A e 12B podemos identificar, respectivamente, redução significativa na umidade e na massa magra da carcaça dos animais cujas mães foram alimentadas com a dieta HL lactacional, quando comparados aos filhotes dos grupos CON/CON e HL/CON.

Em relação à adiposidade corporal, observamos aumento do percentual de lipídeos na carcaça dos animais em resposta à oferta materna da dieta hiperlipídica durante a lactação (Figura 12C e 12D).

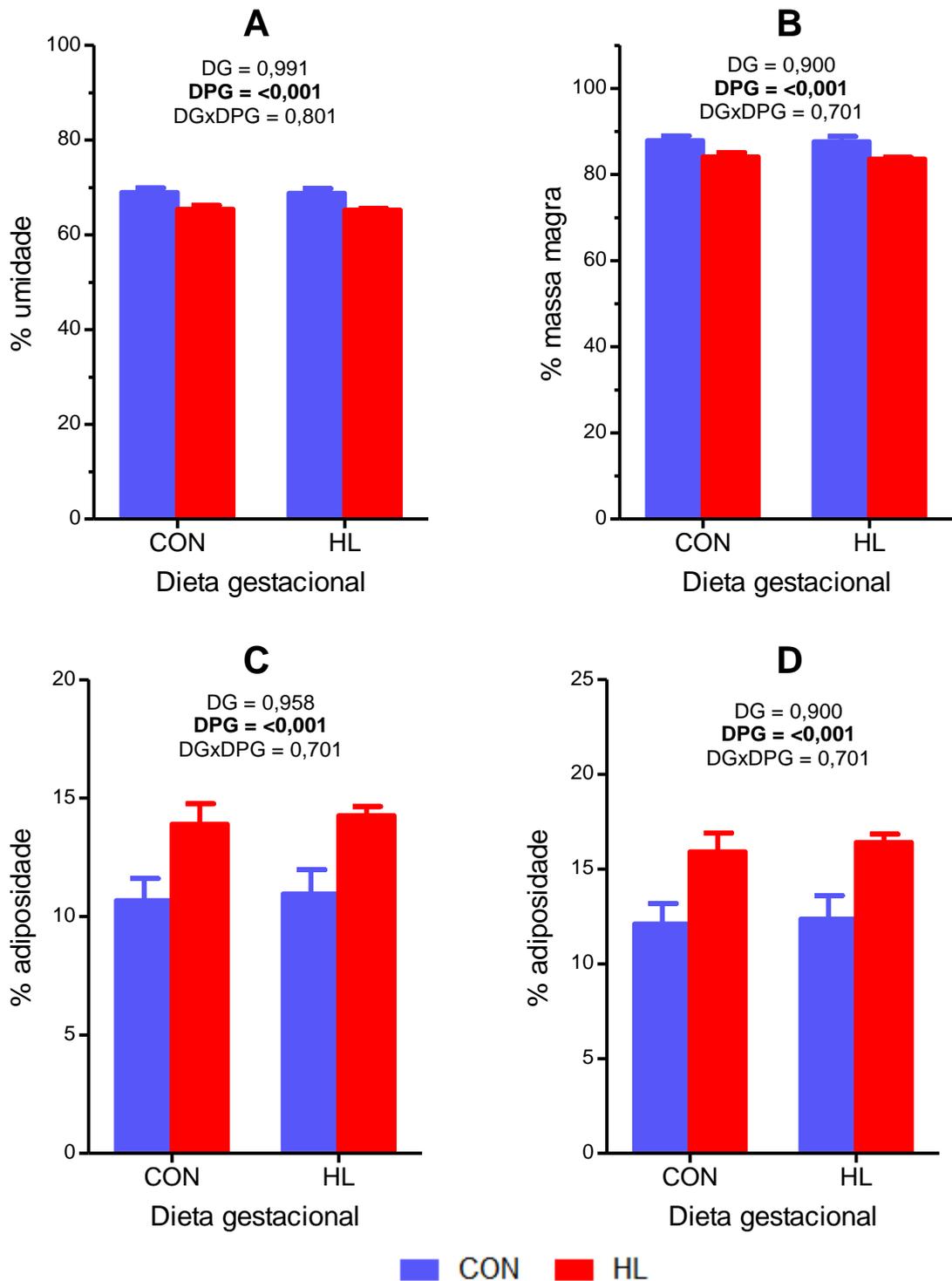


Figura 12. Composição química da carcaça dos animais lactentes.

As figuras A, B, C e D representam, respectivamente, os percentuais de umidade, de massa magra, de adiposidade calculada a partir dos resultados de extração de lipídeos da carcaça seca e de adiposidade calculada a partir da extração de lipídeos da carcaça seca, acrescida das massas dos coxins adiposos. Resultados são expressos como média \pm erro-padrão. Os valores de P para os fatores DG, DPG e DGxDPG foram calculados por ANOVA fatorial. Os resultados que apresentaram $P < 0,05$ encontram-se em negrito. CON: controle. HF: hiperlipídica. DG: dieta gestacional (CON/CON, CON/HL) vs (HL/HL, HL/CON). DPG: dieta pós-gestacional (CON/CON, HL/CON) vs (CON/HL, HL/HL).

6.4.3 Marcadores séricos

A partir da tabela 5, verificamos efeito da dieta pós-gestacional sobre grande parte dos marcadores séricos estudados nas ninhadas, sendo que os grupos experimentais alimentados com a ração hiperlipídica após o nascimento (CON/HL, HL/HL) apresentaram concentrações de triacilgliceróis, de proteínas totais e de colesterol total significativamente mais altas que as dos grupos que receberam ração controle (CON/CON, HL/CON), tanto na primeira (0'), quanto na segunda coleta de sangue (90'). Para todos esses marcadores, ainda foi observada correlação positiva com o percentual de lipídeos da carcaça (Figura 13)

Vale, ainda, citar as alterações no metabolismo da glicose, com tendência para aumento da glicemia nos animais cujas mães foram tratadas com a dieta HL pós-gestacional e com aumento da insulinemia no grupo HL/HL em relação ao grupo recuperado no desmame (HL/CON), efeito observado apenas no momento 90' (Tabela 5). Apesar da ausência de efeito significativo, ao associarmos as concentrações de glicose à adiposidade das carcaças dos animais, observamos a existência de correlação positiva entre os dois marcadores (Figura 13).

Quanto às concentrações dos demais hormônios, detectamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos CON/HL e HL/HL sobre as concentrações de IGF-I, havendo interação entre as dietas gestacional e pós-gestacional no momento da primeira coleta, não sendo, porém, mantido esse efeito após 90 minutos de jejum (tabela 5). Fenômeno semelhante pôde ser observado na análise das concentrações séricas de leptina: os animais eutanasiados na primeira coleta, provenientes de mães que consumiam dieta rica em ácidos graxos saturados durante a lactação, apresentaram hiperleptinemia em relação aos demais. Entretanto, ao avaliarmos o restante da prole após 90 minutos de jejum, verificamos redução na magnitude dessa diferença, com resultante perda na significância. A concentração de leptina, mas não a de IGF-I, apresentou correlação positiva com a adiposidade corporal. Em relação às concentrações de TNF- α , não houve efeito das dietas hiperlipídicas gestacional e pós-gestacional.

Cabe ressaltar que todas as correlações aqui apresentadas derivam de análises de regressão linear entre os resultados de marcadores séricos levantados no período da primeira coleta e a adiposidade da carcaça calculada a partir da extração de lipídeos da carcaça, somada às massas dos coxins adiposos.

Tabela 5. Marcadores séricos referentes aos animais lactentes.

| | CON | | | | HL | | | | Influência dos fatores | | | | | |
|--------------------------|--------------|---------------------------|---------------|----------------------------|--------------|---------------------------|---------------|--------------------------|------------------------|-------|--------|--------|----------|-------|
| | CON | | HL | | CON | | HL | | DG | | DPG | | DG x DPG | |
| | 0 | 90 | 0 | 90 | 0 | 90 | 0 | 90 | 0 | 90 | 0 | 90 | 0 | 90 |
| Glicose (mg/dl) | 174,8 ± 7,53 | 196,1 ± 9,6 | 204,9 ± 17,6 | 218,6 ± 20,2 | 175,8 ± 11 | 193,29 ± 13,8 | 197,2 ± 12,8 | 210,3 ± 10,5 | 0,796 | 0,71 | 0,054 | 0,193 | 0,741 | 0,853 |
| Insulina (ng/ml) | 1,65 ± 0,2 | 1,45 ± 0,13 ^{ab} | 1,36 ± 0,19 | 1,59 ± 0,15 ^{ab} | 0,92 ± 0,39 | 1,81 ± 0,25 ^a | 1,19 ± 0,13 | 0,95 ± 0,17 ^b | 0,222 | 0,445 | 0,958 | 0,053 | 0,616 | 0,01 |
| Tricilgliceróis (mg/dl) | 136,7 ± 13,2 | 219,1 ± 54,6 | 645,3 ± 121,9 | 797,9 ± 138,6 | 228,1 ± 37,7 | 228,8 ± 51,6 | 620,1 ± 121,9 | 520,7 ± 68,2 | 0,757 | 0,180 | <0,001 | <0,001 | 0,586 | 0,152 |
| Coolesterol (mg/dl) | 85,22 ± 2,71 | 106,0 ± 3,68 ^a | 143,65 ± 11,8 | 203,3 ± 16,22 ^b | 84,93 ± 8,95 | 113,2 ± 7,89 ^a | 120,99 ± 7,13 | 158,6 ± 6,4 ^c | 0,196 | 0,075 | <0,001 | <0,001 | 0,207 | 0,017 |
| Proteínas totais (mg/dl) | 2,93 ± 0,07 | 5,18 ± 0,35 | 5,01 ± 0,69 | 14,54 ± 2,44 | 2,96 ± 0,27 | 5,45 ± 0,38 | 5,54 ± 0,82 | 8,42 ± 1,08 | 0,659 | 0,094 | 0,001 | 0,001 | 0,695 | 0,070 |
| IGF-1 (ng/dl) | 131,2 ± 28,6 | 137,6 ± 24,6 | 70,1 ± 8,84 | 97,3 ± 14,4 | 101,6 ± 10,7 | 179,8 ± 34 | 170,4 ± 27,9 | 126,2 ± 18,4 | 0,146 | 0,152 | 0,871 | 0,062 | 0,012 | 0,783 |
| Leptina (ng/dl) | 4,41 ± 0,67 | 5,27 ± 0,67 | 5,55 ± 0,77 | 6,32 ± 1,18 | 5,38 ± 0,88 | 5,03 ± 0,62 | 7,34 ± 0,47 | 6,85 ± 0,47 | 0,067 | 0,853 | 0,041 | 0,091 | 0,576 | 0,641 |
| TNF- α (pg/ml) | 3,67 ± 0,3 | 3,05 ± 0,34 | 3,81 ± 0,61 | 3,21 ± 0,55 | 3,94 ± 0,57 | 3,99 ± 0,62 | 3,81 ± 0,47 | 3,88 ± 0,71 | 0,792 | 0,18 | 0,994 | 0,966 | 0,787 | 0,822 |

Resultados são expressos como médias ± desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes, calculadas por ANOVA fatorial seguida de teste de Tukey. Os valores de *P* para os fatores DG, DPG e DFxDPG foram calculados por ANOVA fatorial. Os resultados que apresentaram *P*<0,05 encontram-se em negrito. CON: controle. HF: hiperlipídica. DG: dieta gestacional (CON/CON, CON/HL) vs (HL/HL, HL/CON). DPG: dieta pós-gestacional (CON/CON, HL/CON) vs (CON/HL, HL/HL).

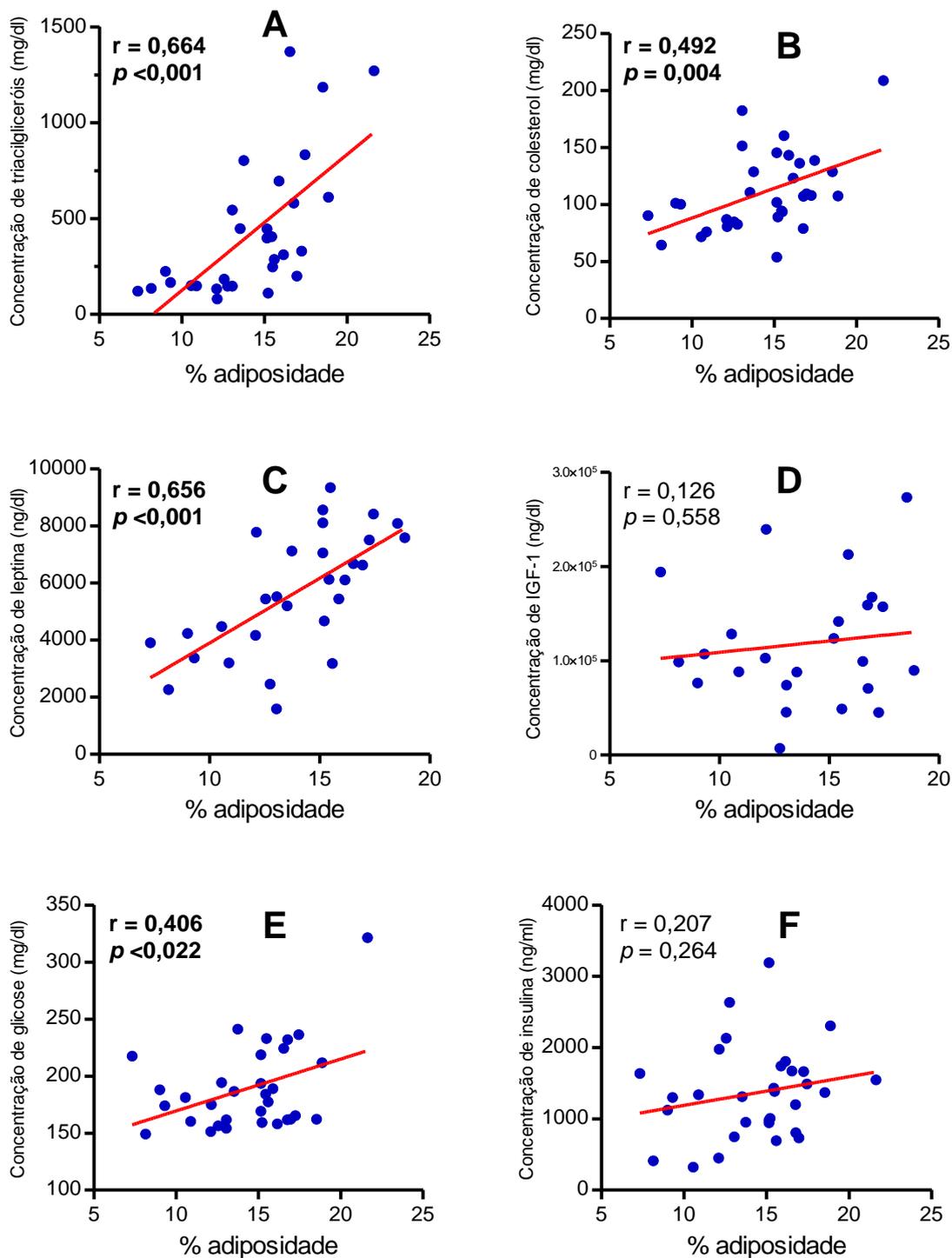


Figura 13. Correlação entre o percentual de adiposidade da carcaça e os diferentes marcadores séricos estudados nos animais lactentes.

As figuras A, B, C, D, E e F representam as correlações entre o percentual de adiposidade e as concentrações de triacilgliceróis, de colesterol total, de leptina, de IGF-I, de glicose e de insulina, respectivamente. Os valores de r e P para as correlações foram calculados por regressão linear. Os resultados que apresentaram $P < 0,05$ encontram-se em negrito.

6.4.4 Morfometria

Para avaliação histológica do tecido muscular esquelético, cortes foram corados com hematoxilina e eosina.

Inicialmente, não verificamos efeitos da variação da dieta materna sobre a área da secção transversa do músculo gastrocnêmio e dos miócitos nos filhotes com 21 dias de idade (figura 14). Entretanto, através da observação do percentual da área de miócitos em relação à área total de cada campo óptico observado, verificamos redução em resposta ao consumo da dieta hiperlipídica pós-gestacional. Através dos dados expostos na tabela 6, explicitamos a concomitante redução na contagem de miócitos por campo observado.

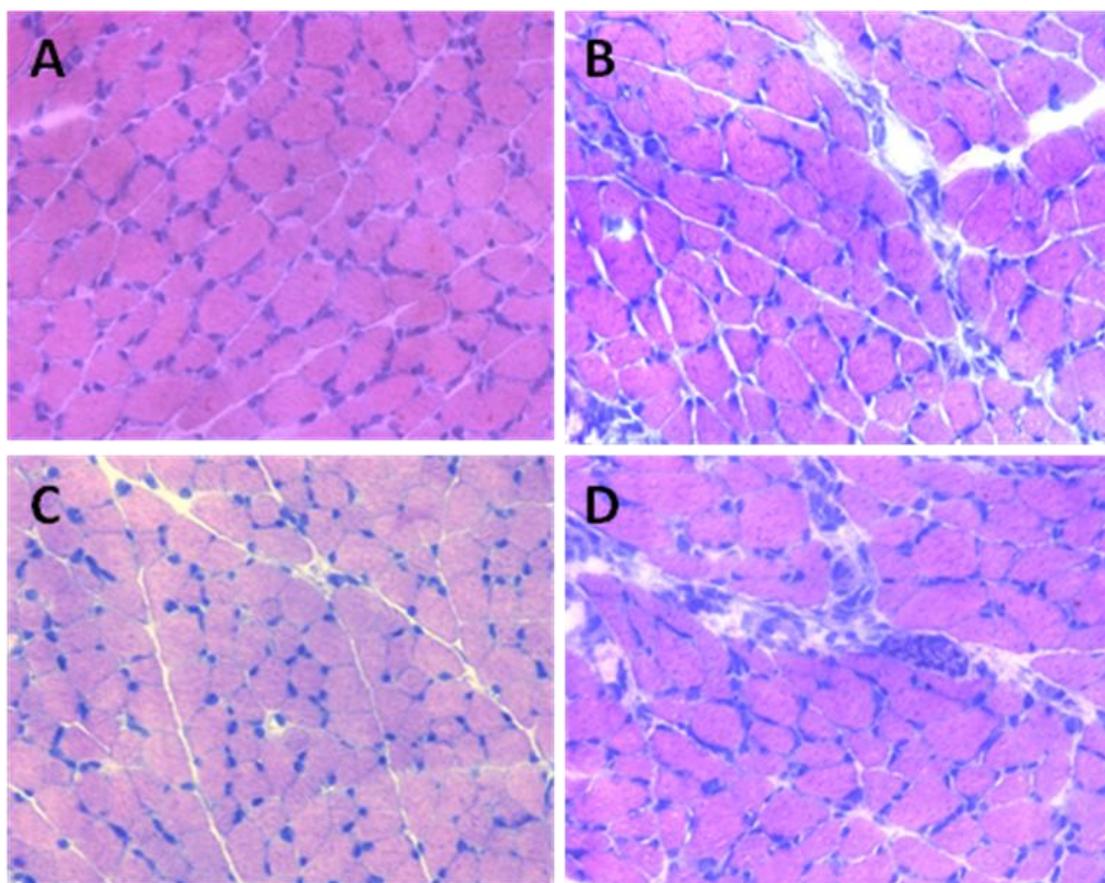


Figura 14. Cortes histológicos referentes aos animais eutanasiados no desmame.

As figuras A, B, C e D correspondem, respectivamente, às secções transversas dos músculos gastrocnêmios dos filhotes cujas mães receberam dieta controle durante a gestação e a lactação (A), dieta controle gestacional e hiperlipídica pós-gestacional (B), dieta hiperlipídica gestacional e controle pós-gestacional (C) e dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação (D).

Tabela 6. Marcadores histológicos avaliados nos filhotes ao final da lactação.

| | CON | | HL | | Influência dos fatores | | |
|---|---|-----------------------|----------------------|---------------------|------------------------|------------------|----------|
| | CON | HL | CON | HL | DG | DPG | DG x DPG |
| | Área da secção transversa do músculo (mm ²) | 17,90 ± 1,71 | 16,71 ± 1,74 | 17,89 ± 1,47 | 21,99 ± 1,90 | 0,145 | 0,414 |
| Área da secção transversa do miócito (µm ²) | 475,48 ± 18,84 | 454,92 ± 50,93 | 401 ± 38,18 | 531,31 ± 29,89 | 0,980 | 0,159 | 0,058 |
| % miócitos por campo (%) | 90,86 ± 1,79 | 84,05 ± 1,70 | 93,17 ± 2,34 | 83,34 ± 2,51 | 0,926 | <0,001 | 0,813 |
| Número de miócitos por campo (un) | 122,99 ± 10,49 | 105,79 ± 12,10 | 142,13 ± 7,27 | 88,12 ± 6,59 | 0,940 | 0,001 | 0,069 |
| Densidade de miócitos (un) | 25.914 ± 1.884 | 24.782 ± 3.692 | 30.376 ± 1.699 | 24.200 ± 721 | 0,441 | 0,153 | 0,319 |

Resultados são expressos como média ± erro-padrão. Os valores de *P* para os fatores DG, DPG e DGxDPG foram calculados por ANOVA fatorial. Os resultados que apresentaram *P* < 0,05 encontram-se em negrito. CON: controle. HF: hiperlipídica. DG: dieta gestacional (CON/CON, CON/HL) vs (HL/HL, HL/CON). DPG: dieta pós-gestacional (CON/CON, HL/CON) vs (CON/HL, HL/HL).

A partir dos resultados apresentados na figura 15, verificamos ainda a existência de correlação positiva entre o percentual de adiposidade e os marcadores indicativos de redução no desenvolvimento muscular esquelético, caso das massas dos músculos gastrocnêmio e sóleo e do percentual e número de miócitos por campo observado. As correlações derivam de análises de regressão linear entre os resultados de marcadores morfológicos e a adiposidade da carcaça somada às massas dos coxins adiposos.

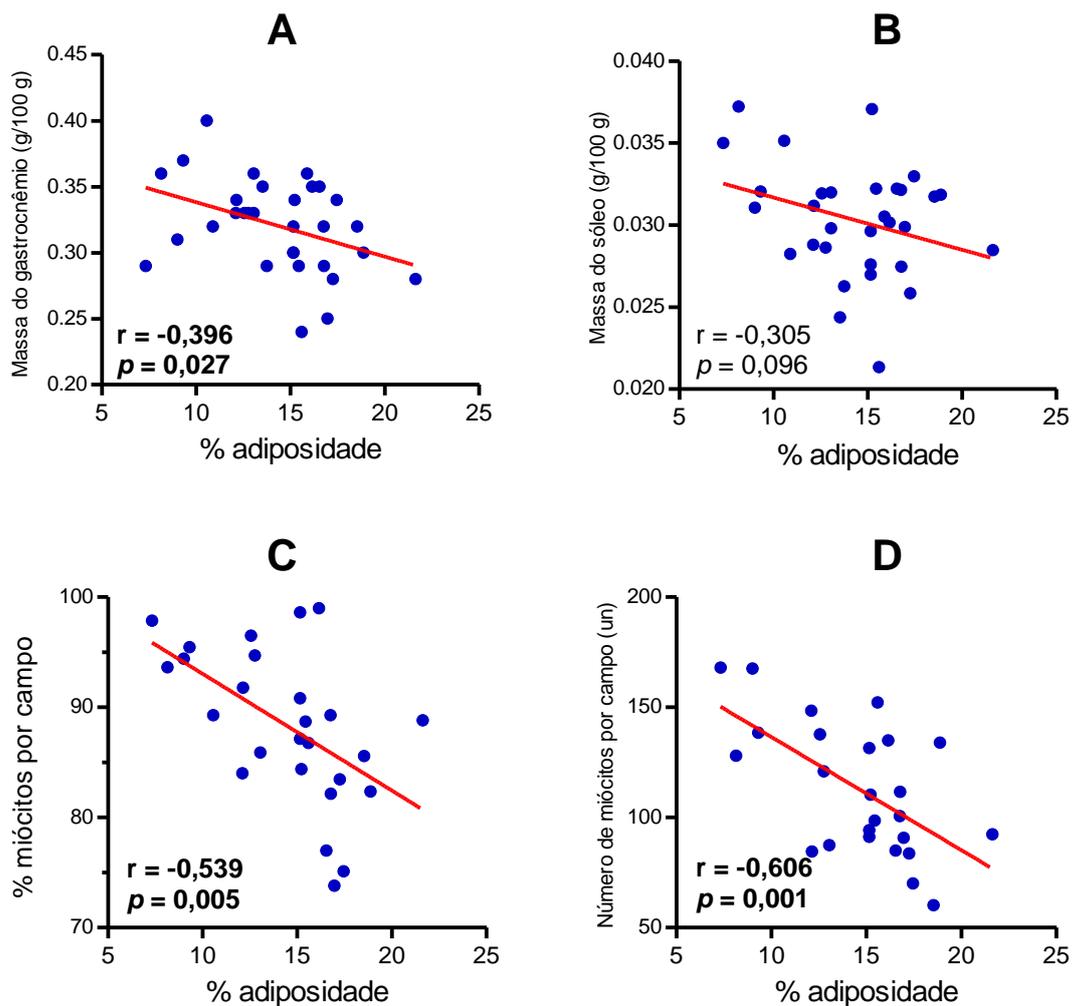


Figura 15. Correlação entre o percentual de adiposidade da carcaça e os diferentes marcadores morfológicos e histológicos estudados nos animais lactentes.

As figuras A, B, C e D representam, respectivamente, as correlações entre o percentual de adiposidade e as massas dos músculos gastrocnêmio e sóleo, o percentual de miócitos por campo óptico observado e o número de miócitos por campo. Os valores de r e P para as correlações foram calculados por regressão linear. Os resultados que apresentaram $P < 0,05$ encontram-se em negrito.

6.4.5 Western Blotting - Primeira coleta

Os dados a seguir referem-se aos resultados obtidos por *Western Blotting* do extrato total de proteínas musculares de lactentes eutanasiados na primeira coleta das amostras, em período pós-prandial.

6.4.5.1 Expressão e fosforilação da Akt

A expressão da proteína quinase Akt no músculo esquelético da prole não foi afetada pelo tratamento dietético ao qual as matrizes foram submetidas (Figura 16). No entanto, a sua fosforilação em treonina 473 esteve aumentada em resposta ao consumo materno da dieta HL durante a lactação, efeito não observado na fosforilação em treonina 308 (Figura 16).

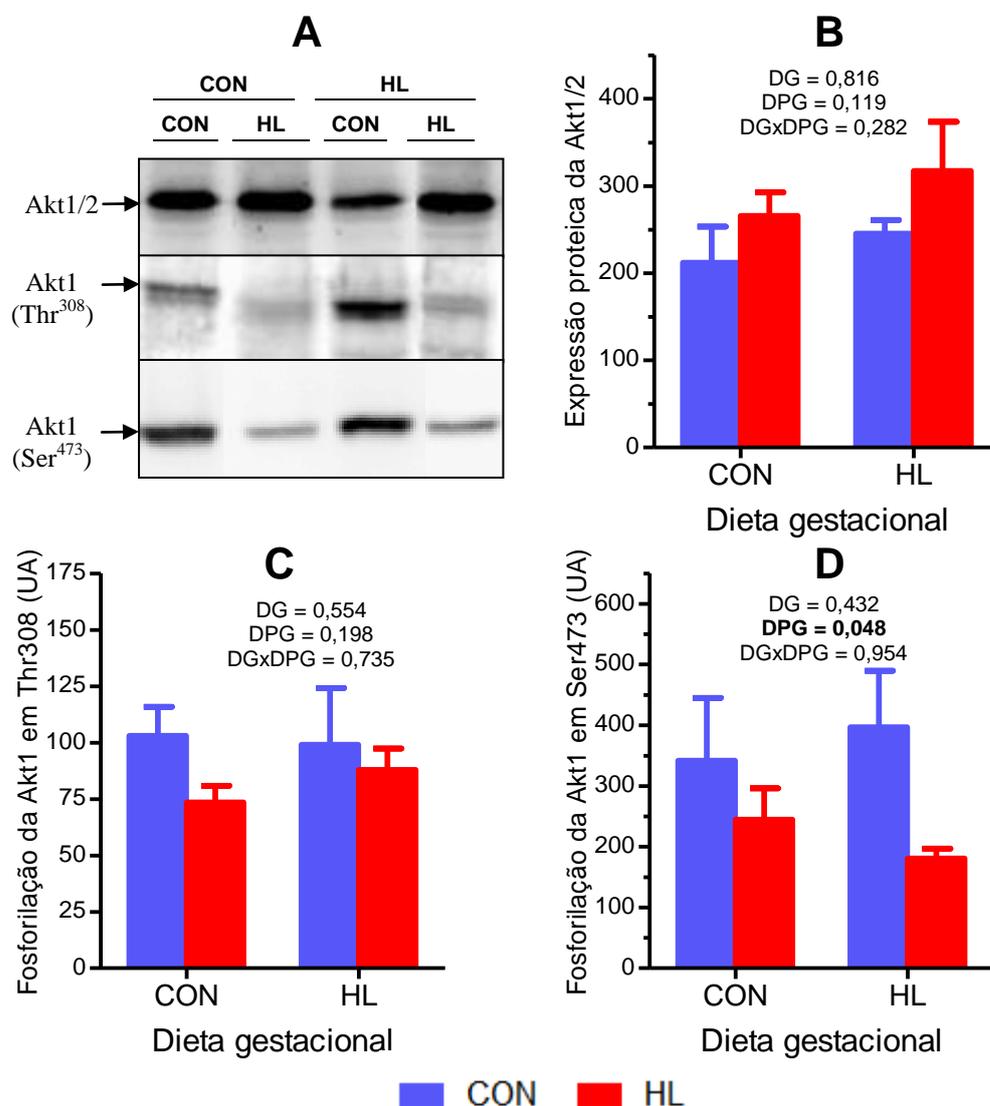


Figura 16. Expressão e fosforilação da Akt nos resíduos de treonina 308 e 473 no músculo esquelético dos animais lactentes em período pós-prandial.

A figura A é composta por fotos representativas dos *blottings* referentes à expressão e à fosforilação da Akt em Thr308 e em Ser473. As figuras B, C e D representam, respectivamente os resultados obtidos de expressão proteica, de fosforilação em Thr308 e de fosforilação em Ser473. Resultados são expressos como média \pm erro-padrão. Os valores de *P* para os fatores DG, DPG e DGxDPG foram calculados por ANOVA fatorial. Os resultados que apresentaram $P < 0,05$ encontram-se em negrito. CON: controle. HF: hiperlipídica. DG: dieta gestacional (CON/CON, CON/HL) vs (HL/HL, HL/CON). DPG: dieta pós-gestacional (CON/CON, HL/CON) vs (CON/HL, HL/HL).

6.4.5.2 Expressão e fosforilação do mTOR

Na figura 17, estão representados os resultados de expressão e fosforilação no resíduo de serina 2448 do mTOR no músculo esquelético dos animais dos diferentes grupos experimentais no desmame. Como é possível observar, não houve efeito das dietas HL gestacional e pós-gestacional no primeiro período de coleta.

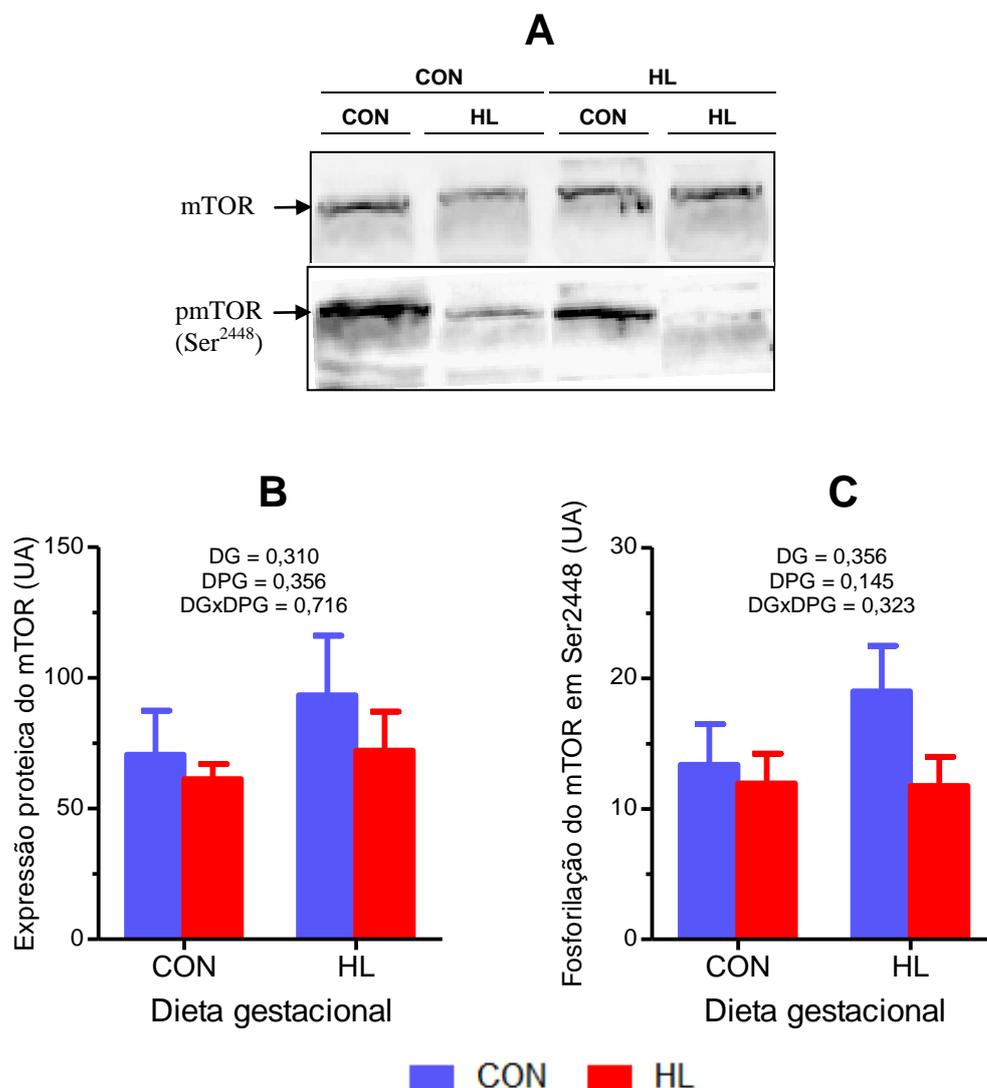


Figura 17. Expressão e fosforilação do mTOR no resíduo de serina 2448 no músculo esquelético dos animais lactentes em período pós-prandial.

A figura A é composta por fotos representativas dos *blottings* referentes à expressão e à fosforilação do mTOR Ser2448. As figuras B e C representam, respectivamente, os resultados obtidos de expressão proteica e de fosforilação em Ser2448. A figura B representa os resultados obtidos. Resultados são expressos como média \pm erro-padrão. Os valores de *P* para os fatores DG, DPG e DGxDPG foram calculados por ANOVA fatorial. CON: controle. HF: hiperlipídica. DG: dieta gestacional (CON/CON, CON/HL) vs (HL/HL, HL/CON). DPG: dieta pós-gestacional (CON/CON, HL/CON) vs (CON/HL, HL/HL).

6.4.5.3 Expressão e fosforilação da S6K1

Na figura 18, estão representados os resultados referentes à expressão e à fosforilação no resíduo de treonina 389 da proteína quinase S6K1 no músculo esquelético dos animais lactentes. Observa-se efeito da dieta HL pós-gestacional sobre a atividade da proteína, com resultante diminuição da fosforilação.

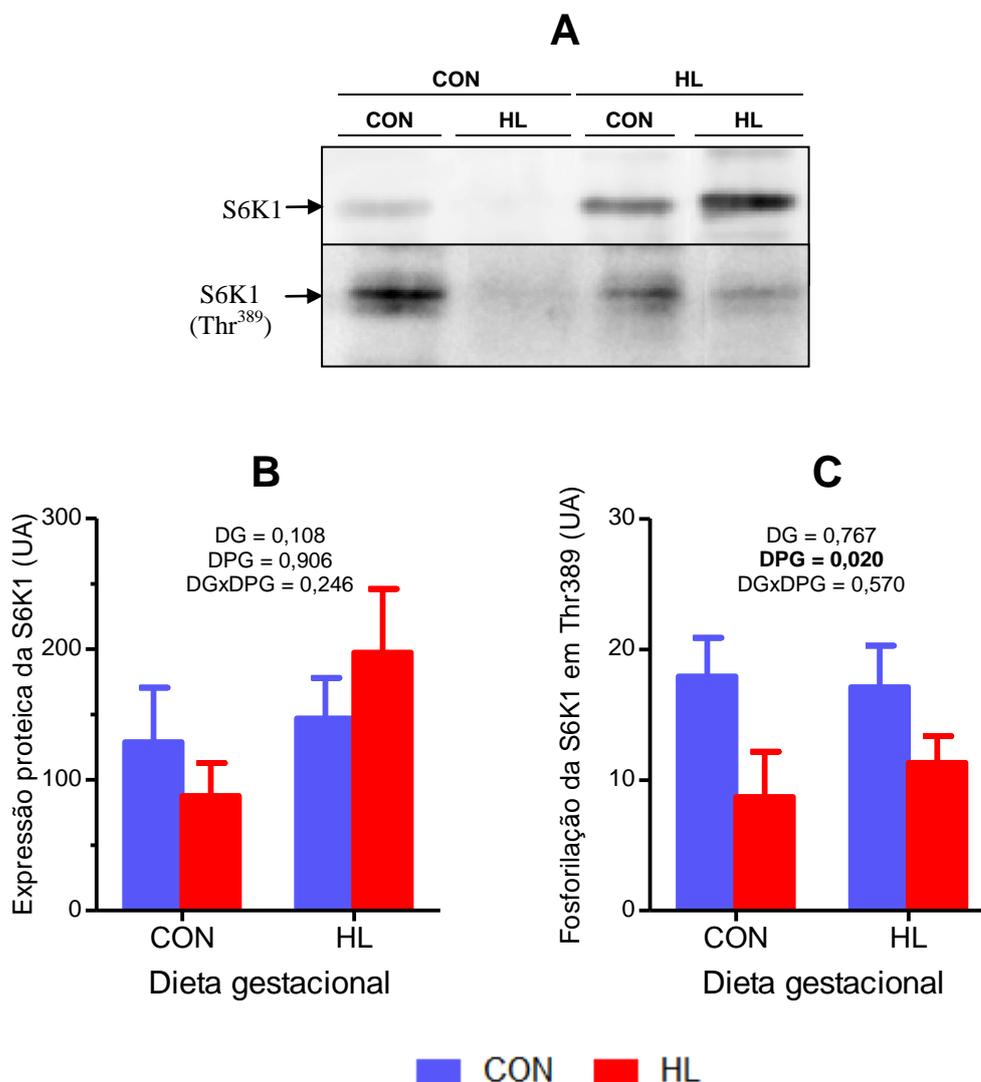


Figura 18. Expressão e fosforilação da S6K1 no resíduo de treonina 308 no músculo esquelético dos animais lactentes em período pós-prandial.

A figura A é composta por fotos representativas dos *blottings* referentes à expressão e à fosforilação da S6K1 em Thr389. As figuras B e C representam, respectivamente, os resultados obtidos de expressão proteica e de fosforilação em Thr389. Resultados são expressos como média \pm erro-padrão. Os valores de *P* para os fatores DG, DPG e DGxDPG foram calculados por ANOVA fatorial. Os resultados que apresentaram $P < 0,05$ encontram-se em negrito. CON: controle. HF: hiperlipídica. DG: dieta gestacional (CON/CON, CON/HL) vs (HL/HL, HL/CON). DPG: dieta pós-gestacional (CON/CON, HL/CON) vs (CON/HL, HL/HL).

6.4.5.4 Expressão e fosforilação da 4E-BP1

A partir da figura 19, podemos observar os resultados de expressão e de percentual de fosforilação da forma *gamma* da 4E-BP1 no músculo esquelético dos animais lactentes. Com base nos dados obtidos, verificamos aumento da fosforilação da forma *gamma* em relação à soma da fosforilação de todas as formas migratórias.

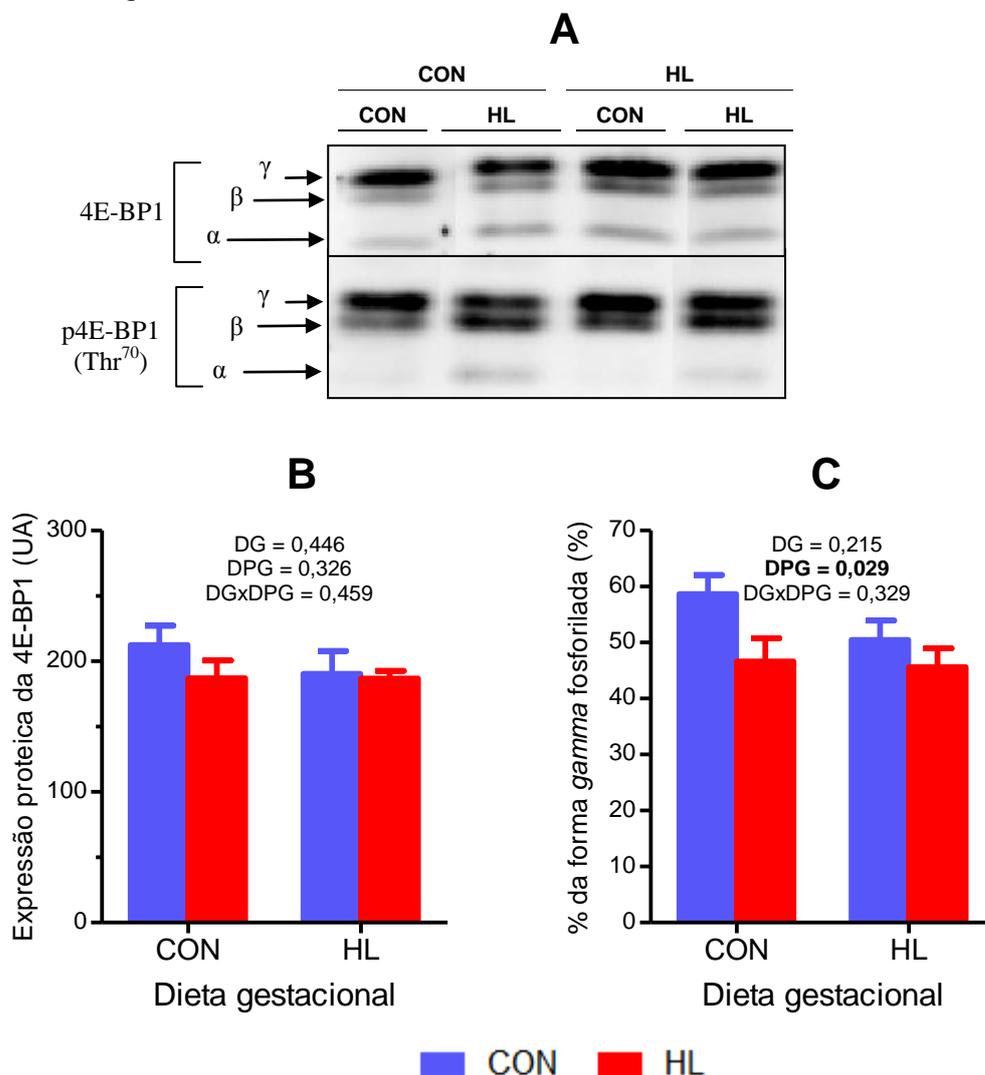


Figura 19. Expressão das diferentes subunidades e percentual de fosforilação da subunidade *gamma* da 4E-BP1 no músculo gastrocnêmio dos animais lactentes em período pós-prandial.

A figura A é composta por fotos representativas dos *blottings* referentes à expressão e à fosforilação da 4E-BP1 em Thr70. As figuras B e C representam, respectivamente, os resultados obtidos de expressão proteica e de percentual da forma *gamma* fosforilada. Resultados são expressos como média \pm erro-padrão. Os valores de *P* para os fatores DG, DPG e DGxDPG foram calculados por ANOVA fatorial. Os resultados que apresentaram $P < 0,05$ encontram-se em negrito. CON: controle. HF: hiperlipídica. DG: dieta gestacional (CON/CON, CON/HL) vs (HL/HL, HL/CON). DPG: dieta pós-gestacional (CON/CON, HL/CON) vs (CON/HL, HL/HL).

6.4.6 Western Blotting - Segunda coleta

A seguir, expomos os resultados obtidos por *Western Blotting* referentes ao extrato total de proteínas musculares dos animais com 21 dias de vida, eutanasiados na segunda coleta de amostras, após jejum de 90 minutos.

6.4.6.1 Expressão e fosforilação da Akt

Como observado a partir da figura 20, não houve efeito das dietas experimentais sobre a expressão e a fosforilação da Akt.

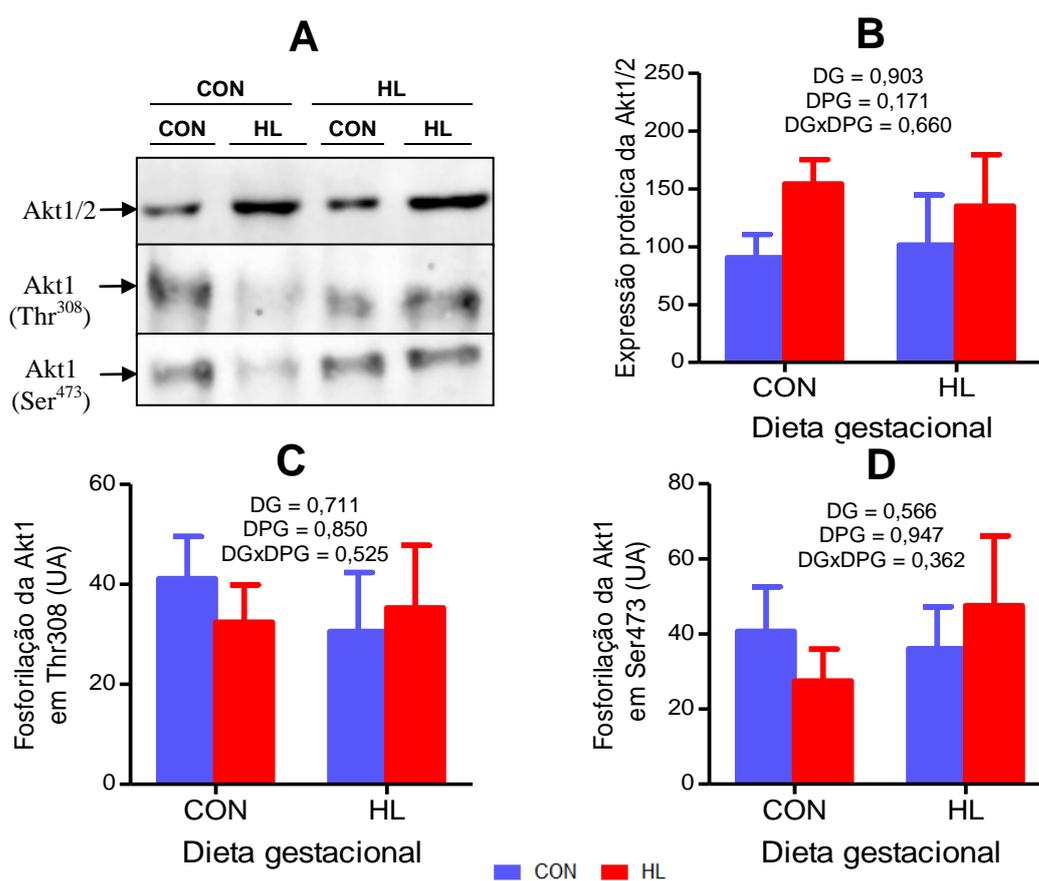


Figura 20. Expressão e fosforilação da Akt nos resíduos de treonina 308 e treonina 473 no músculo esquelético dos animais lactentes após jejum de 90 minutos.

A figura A é composta por fotos representativas dos *blottings* referentes à expressão e à fosforilação da Akt em Thr308 e em Ser473. As figuras B, C e D representam, respectivamente, os resultados obtidos de expressão proteica, de fosforilação em Thr308 e de fosforilação em Ser473. Resultados são expressos como média \pm erro-padrão. Os valores de *P* para os fatores DG, DPG e DGxDPG foram calculados por ANOVA fatorial. Os resultados que apresentaram *P* < 0,05 encontram-se em negrito. CON: controle. HF: hiperlipídica. DG: dieta gestacional (CON/CON, CON/HL) vs (HL/HL, HL/CON). DPG: dieta pós-gestacional (CON/CON, HL/CON) vs (CON/HL, HL/HL).

6.4.6.2 Expressão e fosforilação do mTOR

A figura 21 representa os resultados referentes à expressão e à fosforilação no resíduo de serina 2448 do mTOR no músculo esquelético dos animais lactentes dos diferentes grupos experimentais aos 90 minutos após a última mamada. Como na primeira coleta, não observamos efeito das dietas gestacional ou pós-gestacional sobre esses marcadores.

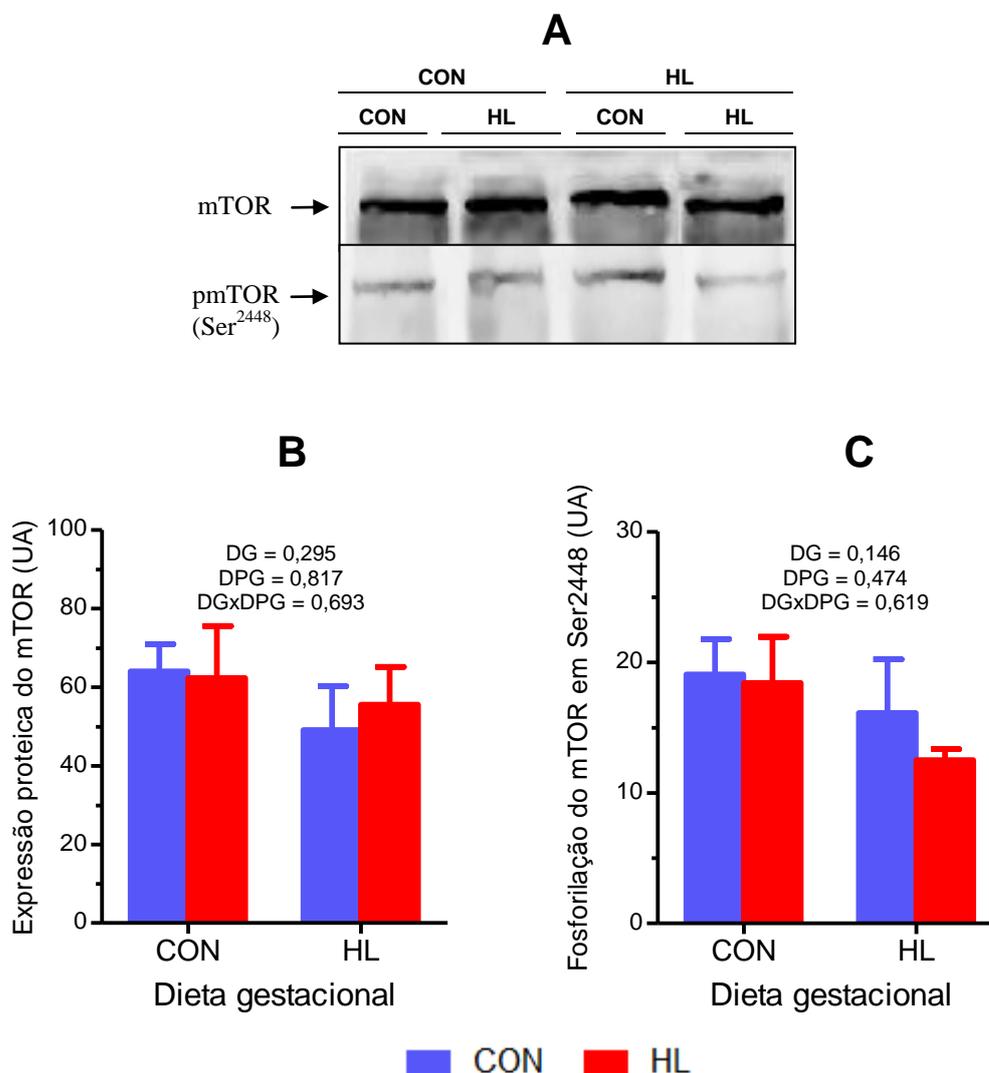


Figura 21. Expressão e fosforilação do mTOR no resíduo de serina 2448 no músculo esquelético dos animais lactentes após jejum de 90 minutos.

A figura A é composta por fotos representativas dos *blottings* referentes à expressão e à fosforilação do mTOR Ser2448. As figuras B e C representam, respectivamente, os resultados obtidos de expressão proteica e de fosforilação em Ser2448. A figura B representa os resultados obtidos. Resultados são expressos como média \pm erro-padrão. Os valores de *P* para os fatores DG, DPG e DGxDPG foram calculados por ANOVA fatorial. CON: controle. HF: hiperlipídica. DG: dieta gestacional (CON/CON, CON/HL) vs (HL/HL, HL/CON). DPG: dieta pós-gestacional (CON/CON, HL/CON) vs (CON/HL, HL/HL).

6.4.6.3 Expressão e fosforilação da S6K1

A partir da figura 22, podemos observar a ausência de efeito isolado das dietas gestacional e pós-gestacional sobre a expressão e a fosforilação da S6K1 no músculo dos animais com 21 dias de vida após jejum de 90 minutos. Entretanto, verificamos interação entre as dietas sobre a expressão proteica, não havendo, porém, diferença significativa entre os grupos.

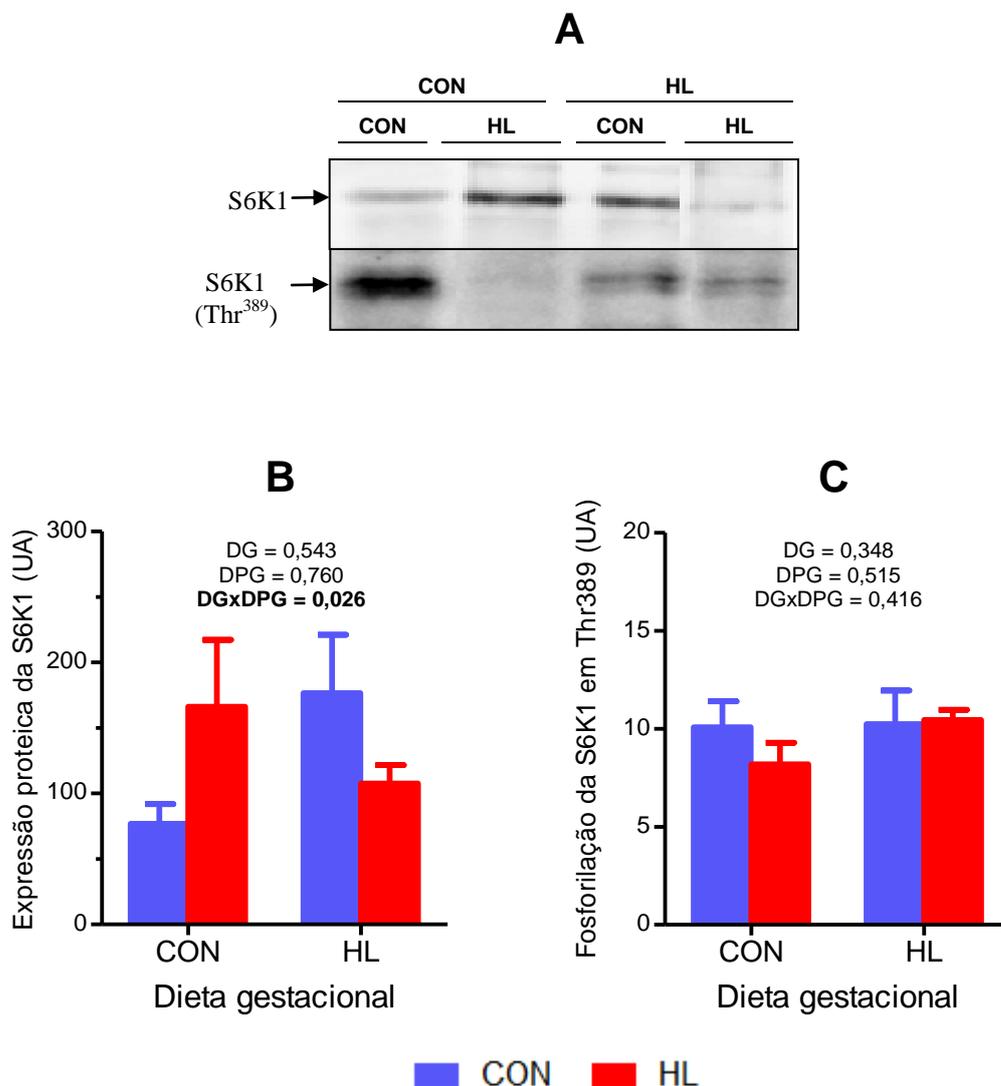


Figura 22. Expressão e fosforilação da S6K1 no resíduo de treonina 308 no músculo esquelético dos animais lactentes após jejum de 90 minutos.

A figura A é composta por fotos representativas dos *blottings* referentes à expressão e à fosforilação da S6K1 em Thr389. As figuras B e C representam, respectivamente, os resultados obtidos de expressão proteica e de fosforilação em Thr389. Resultados são expressos como média \pm erro-padrão. Os valores de *P* para os fatores DG, DPG e DGxDPG foram calculados por ANOVA fatorial. Os resultados que apresentaram *P* < 0,05 encontram-se em negrito. CON: controle. HF: hiperlipídica. DG: dieta gestacional (CON/CON, CON/HL) vs (HL/HL, HL/CON). DPG: dieta pós-gestacional (CON/CON, HL/CON) vs (CON/HL, HL/HL).

6.5 Resumo dos resultados obtidos

A tabela 7 aponta, de forma resumida, os resultados obtidos no presente estudo, referentes aos filhotes com 1 e com 21 dias de vida.

Tabela 7. Resumo dos resultados obtidos no estudo.

| | CON | HL | |
|---|-----|-----|--------|
| ANIMAIS NEONATOS | | | |
| Massa do músculo gastrocnêmio | — | — | |
| Massa do fígado | — | ↓ | |
| IGF-I | — | ↓ | |
| TNF α | — | — | |
| Lipidemia | — | — | |
| Leptinemia | — | ↓ | |
| Insulinemia | — | — | |
| Glicemia | — | — | |
| pAkt(Thr308) | — | ↑ | |
| pAkt(Ser473) | — | — | |
| pmTOR(Ser2448) | — | ↑ | |
| pS6K1(Thr308) | — | — | |
| p4E-BP1(Thr70) | — | — | |
| | DG | DPG | DGxDPG |
| ANIMAIS LACTENTES | | | |
| Massa do fígado | — | ↓ | — |
| Massa dos músculos gastrocnêmio e sóleo | — | ↓ | — |
| Desenvolvimento muscular | — | ↓ | — |
| Adiposidade corporal | — | ↑ | — |
| IGF-I | — | — | + |

Tabela 7. Resumo dos resultados obtidos no estudo (continuação).

| | | | |
|----------------|---|---|---|
| IGF-I | — | — | — |
| Lipidemia | — | ↑ | + |
| Leptinemia | — | ↑ | — |
| Insulinemia | — | — | + |
| Glicemia | — | — | — |
| pAkt(Thr308) | — | — | — |
| pAkt(Ser473) | — | ↓ | — |
| pmTOR(Ser2448) | — | — | — |
| pS6K1(Thr308) | — | ↓ | — |
| p4E-BP1(Thr70) | — | ↓ | — |

CON: Controle. HF: Hiperlipídica. Travessão indica ausência de efeito. Seta apontada para cima indica efeito positivo. Seta apontada para baixo indica efeito negativo. Sinal de adição indica presença de efeito.

7. DISCUSSÃO

A prevalência global de obesidade configura-se como o principal problema de saúde pública da sociedade contemporânea, apresentando relação com um conjunto de agentes etiológicos que incluem fatores genéticos e ambientais, sendo a dieta um dos mais importantes. Ressaltamos que os períodos de desenvolvimento fetal e de crescimento pós-gestacional representam importantes pontos de programação do fenótipo obesogênico e que a dieta materna tem importante influência nesse fenômeno. Uma vez que já foram observadas alterações nas proles em resposta ao consumo materno de dietas hiperlipídicas, procuramos, com este estudo, propor novos conceitos para o enriquecimento dos debates acerca deste assunto, para posterior discussão sobre estratégias que busquem reduzir o impacto do comportamento obesogênico materno, proporcionando melhor qualidade de vida aos indivíduos afetados.

Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho que avalia o desenvolvimento tecidual e a atividade das proteínas componentes da via do mTOR no músculo esquelético de animais neonatos e desmamados, provenientes de matrizes alimentadas com uma dieta rica em ácidos graxos saturados, oferecida em apenas um ou em ambos os períodos de tratamento (gestação e lactação). Em relação aos animais recém-nascidos, obtivemos resultados inesperados quanto à atividade das proteínas relacionadas à via do mTOR, de modo que questões acerca dos possíveis mediadores envolvidos foram propostas neste trabalho. Adicionalmente, dado que nossos resultados referentes aos animais desmamados apresentaram efeito da dieta lactacional sobre os diferentes marcadores estudados, concluímos que demonstrar a influência das dietas gestacional e pós-gestacional sobre esses animais, configuraria a forma mais adequada de apresentá-los.

No texto que se segue, fazemos menção aos resultados obtidos e propomos debates e explicações a respeito dos mesmos, buscando a integração das informações para enriquecimento das conclusões propostas.

7.1 Ratas gestantes e lactantes recebendo dieta hiperlipídica têm o consumo absoluto reduzido

O perfil de ácidos graxos das dietas experimentais ainda não foi determinado e inferências acerca de seu consumo seriam imprecisas. Porém, com o respaldo de informações de rotulagem e de estudos de composição de alimentos (SILVA & GIOIELLI, 2006), especulamos que a oferta da dieta HL provocou aumento no consumo materno de ácidos graxos saturados, especialmente de palmitato e estearato.

Durante todo o período experimental, pudemos verificar diferenças significantes no consumo alimentar entre os grupos estudados. A opção pela apresentação da média semanal, em detrimento ao consumo absoluto e energético total, teve como base a intensa flutuação dos resultados individuais existentes durante a gestação e a lactação, que refletem as demandas específicas em cada momento apresentado. Segundo o *National Research Council* (1997), o consumo alimentar de ratas tende a aumentar entre 10 e 20 % nos primeiros dias de gestação, subindo para cerca de 140 % até o 18º e mantendo-se ascendente no período pós-natal, refletindo o aumento da produção de energia, a necessidade de síntese dos tecidos fetais e a produção e secreção constante de leite para a ninhada.

Como reportado anteriormente em trabalhos similares (GUO & JEN, 1995), as matrizes que recebiam a ração hiperlipídica durante a gestação e/ou a lactação apresentaram o consumo reduzido em praticamente todos os períodos estudados. Esse fenômeno tem como origem uma característica da espécie, representada por um mecanismo adaptativo que provoca o ajuste do consumo alimentar, no intuito de obter-se apenas o aporte energético suficiente para que o animal alcance suas necessidades diárias. Interessantemente, o consumo do grupo HL/HL não diferiu significativamente do grupo CON/CON e de ambos os grupos com dieta CON pós-gestacional na primeira e na terceira semanas de lactação, respectivamente. Tal fato poderia indicar possíveis indícios de desenvolvimento de distúrbios na regulação hipotalâmica do apetite, comum entre animais submetidos ao consumo crônico de dietas obesogênicas (FAM *et al.*, 2007).

Em condições normais, com o intuito de manter-se o balanço energético, reguladores neurais (sensores nutricionais) são sensibilizados e geram sinais para os circuitos nervosos que controlam o consumo alimentar e o gasto energético (LEONARD & BERTHOUD *et al.*, 2008). Esse fenômeno é conhecido como regulação homeostática da adiposidade e da massa corporal, o qual, em outras palavras, corresponde a um mecanismo adaptativo que busca manter a homeostase em condições de consumo de dietas que não atinjam ou ultrapassem as necessidades energéticas. Os mecanismos que atuam sobre essa regulação compreendem uma extensa e complexa rede de comunicação que inclui a atividade de hormônios, neurônios e neurotransmissores que serão citados mais adiante neste texto.

Uma vez que o consumo absoluto da ração hiperlipídica foi reduzido em grande parte do estudo, o aporte de macro e micronutrientes também foi afetado, resultando em menor consumo de proteínas, de ácidos graxos essenciais, de vitaminas e de minerais. Trabalhos anteriores demonstraram alterações na composição de fibras musculares de animais jovens em resposta ao consumo materno de dietas pobres em proteínas (MALLINSON *et al.*, 2007), ao passo que um modelo com restrição proteica materna estudado em nosso laboratório resultou em casos de inviabilidade da gestação, abortos espontâneos e restrição do crescimento fetal, com impacto no desenvolvimento muscular esquelético no início da vida (dados enviados para publicação). Assim, a alteração no consumo de nutrientes essenciais pode representar um importante viés no modelo estudado, dadas as possíveis deficiências provocadas sobre o estado nutricional das matrizes e dos filhotes.

No entanto, apesar dos possíveis efeitos relacionados às restrições maternas, desconhecemos, até o momento, trabalhos baseados em dietas pobres em nutrientes específicos que tenham reproduzido com exatidão os efeitos observados neste estudo e acreditamos que o impacto do consumo da dieta utilizada exerça influência característica sobre os marcadores escolhidos. Cabe ainda ressaltar que ajustes na ração, tais como a suplementação dos nutrientes restringidos, tornar-se-iam uma estratégia extremamente difícil, dada a grande variação do consumo materno em resposta às diferentes demandas em cada período da gestação e da lactação. Um possível ajuste do consumo da dieta controle, com intuito de gerar um grupo *pair feeding* também seria

complicado, dado que as matrizes acabariam por sofrer grave restrição energética e redução no crescimento fetal, como demonstrado por Olausson & Sohlström (2003).

Dessa forma, acreditamos que, apesar das limitações, a opção pela dieta hiperlipídica, nos moldes utilizados, representa um modelo adequado para o estudo dos efeitos do consumo materno de uma dieta obesogênica em ratos, como já exemplificado por outros autores (GUO & JEN, 1995; FÉRÉZOU-VIALA *et al.*, 2007).

7.2 Canibalismo

Concomitantemente à redução do consumo, verificamos um comportamento comum entre matrizes alimentadas com dietas que fogem às recomendações para roedores em crescimento: em resposta ao consumo excessivo de gordura (e conseqüente redução no consumo de nutrientes essenciais), algumas ratas canibalizaram a prole. Em estudos anteriores, também baseados na oferta de dietas ricas em ácidos graxos saturados no período perinatal, o comportamento canibal por parte de algumas matrizes já foi identificado, como descrito no trabalho de Guo & Jen (1995), no qual tal prática ocorreu em cerca de 40 % das lactações. No presente trabalho, observamos menor incidência desse comportamento entre as mães que consumiram a dieta hiperlipídica, tanto na gestação quanto na lactação (30 %), o que pode estar relacionado com as diferenças ambientais existentes.

Ressaltamos ainda o canibalismo praticado por uma mãe do grupo de animais que consumiram a dieta hiperlipídica apenas no período pós-gestacional e a ausência desse comportamento entre as mães que tiveram uma dieta de “recuperação” na lactação após serem submetidas à dieta HL gestacional. Com base nesses fatos, podemos inferir que a dieta hiperlipídica consumida no período lactacional pode ser determinante para a ocorrência de canibalismo de filhotes. No entanto, não podemos afirmar se os animais canibalizados foram atacados ou se já estavam mortos, dado que estudos anteriores já indicavam alta taxa de óbito em animais cujas mães foram alimentadas com dietas hiperlipídicas ou de cafeteria (ROLLS & ROWE, 1982; BUE *et al.*, 1989).

Ainda que supormos que as mães atacaram seus filhotes, não podemos afirmar, com certeza, qual seria a origem desse comportamento. Nesse contexto, duas hipóteses nos parecem mais plausíveis: as restrições nutricionais às quais as matrizes foram submetidas podem ter gerado deficiências que culminaram no ataque e consumo das proles; ou a consistência da ração HL pode ter provocado essa reação. Em relação à última hipótese, já é sabido que a alteração da uma dieta dura para uma mais macia, leva à redução da mineralização óssea da mandíbula e à atrofia do músculo masseter em roedores, efeito relacionado com a redução da expressão dos IGF, de seus receptores (IGFR) e de suas proteínas de ligação (IGFBP) nesse tecido (URUSHIYAMA *et al.*, 2003, TANAKA *et al.*, 2007).

Uma estratégia para a exclusão do possível efeito da consistência da dieta HL sobre o comportamento materno em estudos futuros poderia ser o fornecimento de objetos duros para serem roídos pelos animais durante o período experimental como, por exemplo, tubos de PVC.

7.3 Dieta hiperlipídica materna provoca alterações na composição corporal dos filhotes no período de desmame

Diferentes composições de dietas hiperlipídicas maternas têm levado a resultados controversos no que se refere à massa corporal dos filhotes no início de sua vida. Alguns trabalhos, que lançam mão de dietas enriquecidas com lipídeos unicamente, ou que o fazem com concomitante aumento da oferta de carboidratos simples, demonstram tanto ausência de efeito sobre o ganho ponderal dos fetos e dos lactantes (BAYOL, SIMBI & STICKLAND, 2005; FÉRÉZOU-VIALA *et al.*, 2007), quanto maior resposta sobre esses marcadores (GUO & JEN, 2005; DEL PRADO, DELGADO & VILLALPANDO, 1997; CHEN *et al.*, 2008; ODAKA *et al.*, 2010; YAMAGUCHI *et al.*, 2010). Destaca-se que, mesmo quando da ausência de efeito sobre a massa corporal, o consumo materno de dietas hiperlipídicas tende a promover alterações morfológicas sobre a prole (BAYOL, SIMBI & STICKLAND, 2005).

No presente estudo, não observamos diferenças significantes em relação à evolução ponderal materna e dos filhotes entre os diferentes grupos experimentais em todo o período experimental. No entanto, por intermédio da

avaliação da composição química da carcaça, diferenças marcantes foram encontradas nos volumes de massa magra e de massa adiposa entre os animais com 21 dias de vida. Os resultados obtidos sugerem que não houve efeito da dieta hiperlipídica gestacional sobre os lactentes, sendo que, em resposta ao seu consumo durante a amamentação, observamos alterações que incluíram aumento na adiposidade da carcaça, maior volume dos tecidos adiposos brancos epididimal e subcutâneo e redução na umidade corporal. Esses efeitos já foram reportados anteriormente e ressaltam a importância da dieta materna durante a amamentação sobre possíveis alterações na composição do leite (DEL PRADO *et al.*, 1999; BAYOL, SIMBI & STICKLAND, 2005; YAMAGUCHI *et al.*, 2010).

De forma geral, a glândula mamária é capaz de extrair a maior parte dos nutrientes da circulação de forma independente dos sistemas regulatórios maternos e, conseqüentemente, o leite produzido pode conter concentrações adequadas de nutrientes, mesmo em quadros de consumo materno marginal. Todavia, em quadros de deficiência nutricional crônica e em resposta a marcantes variações morfológicas maternas, podem ocorrer alterações na composição láctea, resultando em um leite com diferentes propriedades nutricionais e bioativas (DEL PRADO *et al.*, 1997; PICCIANO & MCDONALD, 2006).

Segundo Jensen (1999), a composição de ácidos graxos do leite é um ponto crítico de regulação pela alimentação, sendo altamente susceptível a alterações na dieta e ao estado nutricional das matrizes. Tal efeito está relacionado à origem dos lipídeos que são secretados na luz das glândulas mamárias durante a produção de leite, os quais provêm de metabólitos de triacilgliceróis alimentares e de ácidos graxos liberados dos coxins adiposos. Nesse sentido, estudos indicam que dietas ricas em ácidos graxos provocam maior secreção absoluta de leite, aumento na concentração de lipídeos e maior proporção de ácidos graxos saturados em relação aos insaturados (DEL PRADO *et al.*, 1997; DEL PRADO *et al.*, 1999).

Del Prado *et al.* (1999) procuraram estudar os mecanismos que atuam na regulação da composição dos lipídeos do leite. Segundo os autores, a produção aumentada de lipídeos na luz alveolar está associada majoritariamente com a transferência desses nutrientes do plasma para o leite,

com menor taxa de lipogênese na glândula mamária. Assim, quando uma dieta rica em lipídeos é consumida, a composição de ácidos graxos do leite tende a refletir a sua composição (HACHEY *et al.*, 1989; DEL PRADO *et al.*, 1999).

Nesse sentido, apesar da ausência de análises comprobatórias no leite materno, acreditamos que a dieta hiperlipídica, quando consumida no período de lactação, tenha, provavelmente, provocado alterações na composição lipídica do mesmo, o que favoreceu o aumento na adiposidade corporal dos lactentes, fato evidenciado pela maior concentração de gordura na carcaça e pelo volume aumentado dos coxins adiposos subcutâneo e epididimal. Dentro desse contexto, dois fatores devem ter sido cruciais para a gênese desse fenótipo: o consumo aumentado de ácidos graxos saturados e o maior aporte energético às proles.

Já está bem estabelecida a relação entre os ácidos graxos saturados dietéticos e a ocorrência da obesidade, havendo, mais recentemente, a descrição de mecanismos que envolvem o estímulo a fatores de transcrição promotores da lipogênese no tecido adiposo, caso do PPAR γ e da SREBP1. Ambos são altamente expressos no tecido adiposo e a sua grande gama de funções inclui a indução da diferenciação de pré-adipócitos em células maduras no tecido subcutâneo e a regulação positiva de importantes hormônios envolvidos na lipogênese e no acúmulo de triacilgliceróis (ADAMS *et al.*, 1997; KLIEWER *et al.*, 2001; SHARMA & STAELS, 2007). A expressão desses fatores é sensível às concentrações plasmáticas de triacilgliceróis, respondendo positivamente ao aumento de ácidos graxos saturados, fato que pode ocasionar perturbações na homeostase lipídica (FRUCHART, STAELS & DURIEZ, 2001). Em estudos semelhantes ao nosso, foi demonstrada relação direta entre a expressão do PPAR γ e o aumento da adiposidade corporal em animais lactentes, cujas mães consumiram dieta hiperlipídica no período gestacional e pós-gestacional (YAMAGUCHI *et al.*, 2010).

O presente trabalho foi marcado pelo aumento do volume do tecido adiposo branco no início da vida dos animais em resposta ao consumo materno de ácidos graxos saturados, da mesma maneira que o observado no estudo de Yamaguchi *et al.* (2010). No entanto, com os resultados obtidos, podemos atribuir esse efeito ao consumo da dieta obesogênica durante a lactação, não

havendo efeito da dieta hiperlipídica gestacional sobre esse marcador, ao menos para os animais estudados no 21º dia de vida.

Devido ao consumo proporcional aumentado de ácidos graxos saturados, podemos especular que o consumo energético final da prole também tenha sido afetado, como o observado por Del Prado *et al.* (1999). Acreditamos, também, que o aumento da adiposidade corporal ainda tenha sido responsável pela hiperleptinemia detectada, que reflete provável redução da sensibilidade à leptina nos órgãos e tecidos alvo, caso do hipotálamo. Uma vez que a sinalização da leptina é bloqueada, seus efeitos anorexígenos estão reduzidos – e o impacto esperado na regulação do apetite desses animais seria o aumento do consumo alimentar.

A resistência hipotalâmica à leptina é caracterizada pela redução da expressão de seu receptor Ob-Rb e do fator STAT3, que estimula a expressão de neuropeptídeos anorexígenos [proopiomelanocortina (POMC) e transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART)], e pelo aumento da expressão do supressor de citocinas 3 (SOCS3), antagonista da atividade da STAT3 (LEONARD & BERTHOUD, 2008). Além desses efeitos sobre a sinalização da leptina, destacamos a possibilidade de alterações na densidade de neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo, que expressam e secretam o neuropeptídeo Y (NPY), também estarem presentes, como já observado anteriormente (PLAGEMANN *et al.*, 1999). Além disso, já existem registros de maior expressão gênica do receptor de NPY em proles de matrizes alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação (CHEN *et al.*, 2008). Esses efeitos, somados à regulação negativa da sinalização da leptina, podem ter sido responsáveis por possível aumento do consumo dos lactentes, afetando severamente seu aporte energético.

Efeitos contrários sobre a leptinemia foram observados nos animais neonatos. Inicialmente, esperávamos que a concentração sérica desse hormônio estivesse aumentada, refletindo o estado fisiológico e metabólico das mães, uma vez que a leptina materna atravessa a barreira hemato-placentária (SMITH & WADDELL, 2003). Surpreendentemente, o resultado obtido foi contrário a essa hipótese e os animais provenientes das mães HL tiveram redução na leptinemia, quadro outrora observado por Morris & Chen (2009) que sugeriram reprogramação, no nascimento, dos reguladores neuronais

hipotalâmicos do apetite e dos componentes da via de sinalização da leptina em resposta à obesidade materna. Vale ressaltar que a última semana de gestação parece ser crucial para essa programação em ratos (MORRIS & CHEN, 2009).

A leptina pode ser secretada por diversos elementos fetais afora o tecido adiposo, sendo o caso do estômago, da placenta, do coração, dos ossos e das cartilagens (BI *et al.*, 1997; HOGGARD *et al.*, 1997; BADO *et al.*, 1998; MORRIS & CHEN, 2009). É possível que os animais, provenientes de mães alimentadas com HL, tenham recebido maior aporte de leptina materna via placenta, havendo atenuação da sua produção endógena, o que provocou baixas concentrações séricas desse hormônio após o período de espera até a coleta de amostras. Outra explicação envolve a redução de transporte placentário de leptina devido à possível resistência na barreira hemato-placentária promovida pelas altas concentrações de triacilgliceróis circulantes nas mães (BANKS *et al.*, 2004; MORRIS & CHEN, 2009).

7.4 Aumento da adiposidade corporal relaciona-se com a hipertrigliceridemia e a hipercolesterolemia no desmame

Em nosso estudo, refletindo a falta de alterações morfológicas, verificamos a ausência de efeito da dieta hiperlipídica gestacional sobre o perfil lipídico dos animais neonatos. Assim, tanto as concentrações de colesterol quanto as de triacilgliceróis não foram alteradas no grupo de animais cujas mães receberam a dieta hiperlipídica em um padrão de resposta já descrito anteriormente (YAMAGUCHI *et al.*, 2010).

Entretanto, ao avaliarmos a prole no 21^o dia de vida, verificamos que o consumo materno da dieta HL durante o período lactacional provoca hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Adicionalmente, uma vez que as concentrações de colesterol total e de triacilgliceróis correlacionam-se positivamente com a adiposidade corporal ($p < 0,001$ e $p = 0,004$, respectivamente; referentes à primeira coleta de sangue), observamos que o perfil lipídico desses animais parece responder tanto ao consumo do leite quanto à composição corporal. Propomos, ainda, que esse quadro mantém um ciclo vicioso no qual o aumento das concentrações séricas de triacilgliceróis e

de colesterol ocorrem por influência da progressão do fenótipo obesogênico que, por sua vez, é mantida pela hipertrigliceridemia. Ainda nesse contexto, a progressão da adiposidade tem, como efeito, a resistência hepática à insulina, induzida pelo acúmulo ectópico de lipídeos em uma condição conhecida por esteatose hepática. O quadro de resistência é acompanhado da superprodução de partículas de lipoproteínas de densidade muito alta (VLDL) e, conseqüentemente, da hipertrigliceridemia e da hipercolesterolemia (LEWIS *et al.*, 2002; BACK-NIELSEN, ALFORD & HOTHER-NIELSEN, 2004).

A resistência hepática à insulina, somada ao aumento do volume do tecido adiposo, configurariam, dessa forma, os principais agentes etiológicos que atuaram na gênese dos distúrbios observados no perfil lipídico da prole em resposta ao consumo materno pós-gestacional da dieta HL.

7.5 Alterações na glicemia pós-prandial são dependentes do tempo da coleta e respondem às alterações na composição corporal

A glicemia pós-prandial dos animais eutanasiados na primeira coleta apresentou tendência para aumento em resposta ao consumo da dieta hiperlipídica e esteve correlacionada positivamente com a adiposidade corporal dos animais, fenômeno observado frequentemente em modelos de obesidade induzida por dieta. Novamente, ressaltamos as possíveis alterações na composição do leite materno que proporcionaram maior aporte de ácidos graxos saturados aos filhotes dos grupos HL pós-gestacional e conseqüente progressão das alterações na composição corporal, que levam ao estabelecimento de um fenótipo obesogênico. A adiposidade aumentada pode ter relação com maiores concentrações de ácidos graxos não esterificados e de hormônios pró-inflamatórios que circulam no plasma e afetam a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos, como descrito mais detalhadamente em itens anteriores deste trabalho (FRANGIOUDAKIS & COONEY, 2005; NIETO-VASQUEZ *et al.*, 2008; WEI *et al.*, 2008).

Análises de ácidos graxos não esterificados não foram previstas originalmente neste trabalho; porém, dado que as concentrações de TNF- α no soro dos lactentes não sofreram efeito das alterações morfológicas, acreditamos que a concentração desses lipídeos no soro dos animais, cujas

mães receberam dieta HL pós-gestacional, possa estar aumentada e atuar como antagonista da sensibilidade periférica à insulina. Ainda, uma vez que a tendência para aumento da glicemia só foi detectada na primeira coleta (0´), acreditamos que as alterações fisiológicas e morfológicas, às quais os animais foram submetidos, interferem diretamente na captação celular de glicose proveniente do leite materno.

Em contraste aos possíveis efeitos do consumo do leite oriundo de matrizes HL durante a lactação sobre o metabolismo da glicose, não observamos alterações significantes nas concentrações de insulina na prole. Verificamos, no entanto, diferença isolada entre os grupos HL/CON e HL/HL, havendo menores concentrações desse analito no grupo HL/HL no período da segunda coleta (90´). Dado que ambos os grupos de animais derivam de mães que receberam dieta HL durante a gestação, podemos propor a possível ação de mecanismos epigenéticos que podem constituir programação fetal com respostas em curto prazo. Com isso, queremos apontar a tentativa de adaptação ao leite produzido em resposta ao alto consumo gestacional materno de ácidos graxos saturados, com o intuito de aumentar a taxa de depuração de insulina.

No trabalho de Dyrskog, Gregersen & Hemansen (2005), foram estudados animais jovens provenientes de mães que receberam uma dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação, ou ambas, e que foram desmamados recebendo ração controle ou ração hiperlipídica. Nesse caso, foi verificada menor capacidade secretória das ilhotas pancreáticas no grupo de animais cujas mães receberam a dieta controle na lactação após uma gestação com dieta HL, efeito não observado nos animais cujas mães receberam a dieta HL por todo o período experimental e que ainda receberam a mesma dieta após a lactação. Os autores propuseram um “efeito protetor” provocado pelo consumo da dieta HL no período gestacional, que favorece a manutenção do controle fisiológico da insulina em caso de consumo desse tipo de dieta após o nascimento.

Tal fenômeno pode ser observado no presente estudo, em que há tendência para a hiperinsulinemia do grupo HL/CON quando comparado ao grupo HL/HL. As diferenças nas respostas observadas neste trabalho em comparação ao supracitado derivam das diferentes abordagens metodológicas

utilizadas, que incluem idade de coleta, período de jejum e composição e tempo de exposição às dietas.

7.6 Resultados paradoxais em relação à atividade da via da insulina no músculo esquelético dos animais neonatos

Tanto a insulina quanto o IGF-I possuem receptores plasmáticos comuns a ambos e estimulam a transdução de um sinal intracelular neles originado. Esse sinal é transmitido a partir dos substratos dos receptores de insulina e, em última instância, encontra a proteína quinase B ou, simplesmente, Akt, que desencadeia uma série de eventos fisiológicos. O *upstream* imediato da Akt nessa via é a PDK, que provoca a sua fosforilação no resíduo de treonina 308, ativando-a e tornando-a apta a participar de mecanismos anabólicos, como o estímulo ao mTOR e à captação de glicose em tecidos insulino-sensíveis (TANIGUCHI, 2008). Uma vez que os animais neonatos deste estudo apresentaram redução nas concentrações séricas do IGF-I, procuramos estudar os possíveis efeitos desse déficit sobre a ativação da Akt, dada a sua importância para a ativação plena do mTOR, foco deste estudo.

Antes, cabe ressaltar que a leptina também regula a atividade da Akt em tecidos insulino-sensíveis, sendo que esse efeito ocorre de maneira indireta. Um dos alvos da leptina em tecidos periféricos é a AMPK que, através da sinalização por esse hormônio, tem a sua atividade inibitória sobre a Akt reduzida, proporcionando aumento da atividade desta última (LONG & ZIERATH *et al.*, 2006).

Surpreendentemente, a fosforilação da Akt no resíduo citado esteve aumentada no músculo gastrocnêmio do grupo de recém-nascidos provenientes de matrizes HL. Esse efeito paradoxal não deve ter relação com as concentrações reduzidas de IGF-I e de leptina, tampouco com a concentração de insulina – que não foi alterada. Para a elucidação desse efeito, mais análises seriam necessárias, além de levadas em consideração as ações de outros efetores da Akt. Dentro da proposta deste trabalho, até o presente momento, não podemos afirmar com certeza a etiologia dos efeitos sobre essa proteína e desconhecemos trabalhos semelhantes que tenham obtido tal resultado.

Com relação aos animais lactentes, não observamos efeito das dietas HL fetal e pós-gestacional sobre a fosforilação da Akt no resíduo de treonina 308, o que reflete os resultados já descritos com relação às concentrações séricas de glicose e de insulina, além da falta de interferência da dieta sobre a concentração de IGF-I.

7.7 Redução do desenvolvimento muscular esquelético em resposta ao consumo materno da dieta hiperlipídica é dependente do período de intervenção

Uma vez configurado o quadro metabólico e fisiológico do modelo utilizado, passamos a estudar as interferências dos diferentes indicadores sobre o desenvolvimento tecidual e sobre mecanismos de síntese proteica no músculo esquelético. Inicialmente, a fim de investigarmos o impacto da dieta hiperlipídica materna sobre o desenvolvimento muscular esquelético da prole, avaliamos a massa muscular e a massa muscular mais alguns marcadores histológicos de músculos da pata dos animais neonatos e recém-desmamados, respectivamente.

Quando avaliada a massa do músculo gastrocnêmio dos animais recém-nascidos, verificamos que não houve efeito da dieta materna sobre o desenvolvimento desse tecido. Zhu *et al.* (2008), em um estudo envolvendo *overfeeding* de ratas, demonstraram aumento na massa do músculo semitendíneo de fetos de matrizes obesas. Contudo, por meio de análises histológicas desses tecidos, os autores consideraram a ocorrência de redução do desenvolvimento muscular, devido à densidade reduzida de miócitos observados. Uma vez que análises semelhantes não foram concretizadas nos tecidos musculares dos animais recém-nascidos do presente estudo, comparações com trabalhos semelhantes são levianas e difíceis de serem debatidas. Propomos apenas que a ausência de alterações na massa muscular desses animais pode ter mascarado possíveis diferenças na composição desse tecido, de modo que a avaliação ponderal não constitui um bom marcador do desenvolvimento muscular esquelético.

Em relação aos animais desmamados, em contraste aos resultados inconclusivos obtidos com os recém-nascidos, verificamos sinais claros de

alterações no desenvolvimento do músculo esquelético em resposta à dieta HL materna lactacional. Esses sinais foram caracterizados pela redução nas massas relativas dos músculos sóleo e gastrocnêmio e pela diminuição do número de fibras musculares por campo óptico observado, resultando em menor densidade de miócitos por campo. Tal resultado pode ter diversas etiologias, refletindo possível aumento do espaço intersticial, acúmulo de gordura intramuscular e/ou infiltração de monócitos (Zhu *et al.*, 2009).

Em 2005, Bayol, Simbi e Stickland administraram uma dieta de cafeteria, rica em ácidos graxos saturados e sacarose, a ratas durante os períodos gestacional e lactacional, sendo que avaliaram cortes histológicos do músculo semitendíneo dos filhotes no 21º dia de vida. Nesse estudo, os autores puderam observar que o desenvolvimento do músculo esquelético havia sido prejudicado, com redução da área de secção transversa do músculo e do número de miócitos por secção, além de acúmulo de gordura intramiofibrilar. Afora os resultados supracitados, obtidos nas análises histológicas em nosso trabalho, não encontramos efeito da dieta HL pós-gestacional sobre a área de secção transversa do músculo gastrocnêmio, tampouco sobre o número de total de miócitos por área muscular. Esses dados diferem daqueles obtidos no estudo de Bayol, Simbi e Stickland (2005), o que, provavelmente, reflete as peculiaridades de cada tipo de dieta.

Existe ainda a possibilidade das limitações metodológicas terem provocado resultados falso-negativos. Para a análise histológica, selecionamos uma porção medial considerada, arbitrariamente, a de maior diâmetro do músculo gastrocnêmio, para que fossem feitos os cortes. Uma vez que essa análise era profundamente subjetiva e dependia da qualidade dos cortes realizados – cortes longitudinais e/ou artefatados configuravam cortes inapropriados e eram descartados, havendo maior desbaste do bloco em algumas amostras –, consideramos, ao menos neste estudo, a secção muscular transversa um marcador de menor precisão que a relação área de miócitos/área do campo observado.

7.8 Dieta hiperlipídica fetal provoca maior fosforilação do mTOR no músculo esquelético do rato neonato sem aumento da sinalização downstream

O objetivo original e principal de nosso trabalho foi a de caracterizar, em músculos esqueléticos de ratos no início da vida, o impacto do consumo materno de uma dieta baseada no consumo de ácidos graxos saturados, sobre alguns pontos de regulação da atividade da via que possui como eixo central a proteína quinase mTOR, a qual representa um “gargalo” para a sinalização proveniente de diversos estímulos mitogênicos ou não, os quais atuam na regulação de enorme gama de processos fisiológicos que regem a homeostase do miócito no início da vida de mamíferos.

A escolha pela avaliação da fosforilação do próprio mTOR, da 4E-BP1 e da S6K1 teve como base a tendência de estudos recentes em utilizar esses marcadores para determinar a sinalização proveniente de aminoácidos, do estado energético celular e de hormônios mitogênicos sobre possível efeito na síntese proteica em diversos tipos celulares (ATHERTON *et al.*, 2005; KOOPMAN *et al.*, 2006; GLEASON *et al.*, 2007; VARY *et al.*, 2007). Entendemos que alterações na fosforilação dessas proteínas *per se* não confirmam o aumento da atividade dessa via e o estímulo ao processo de tradução de RNAm na síntese de proteínas, havendo a necessidade de mais marcadores para uma inferência precisa. Todavia, os resultados abaixo apresentados certamente atuarão como subsídio para estudos posteriores que poderão explorar esse modelo de forma mais aprimorada.

Inicialmente, demonstramos que, em animais neonatos, a dieta hiperlipídica materna produziu efeitos controversos relativos à fosforilação do mTOR. Em resposta à dieta HL, os animais apresentaram aumento da fosforilação dessa proteína no resíduo de serina 2448, que é o sítio pelo qual aminoácidos, insulina e IGF-I a ativam. Esse efeito ocorreu concomitantemente ao aumento da fosforilação da Akt no resíduo de treonina 308, o que demonstra possível sinalização proveniente da insulina e do IGF-I (TANIGUCHI *et al.*, 2008). Curiosamente, como já exposto, a concentração de insulina não

estava alterada e a de IGF-I foi reduzida no momento do nascimento desses animais.

No estudo conduzido por Khamzina *et al.* (2005), propôs-se que a atividade dos componentes da via da insulina e do mTOR em animais obesos era tempo dependente e que, no estado basal – sem o estímulo da insulina – a fosforilação do mTOR e da Akt estavam aumentados. Uma vez que, no nascimento, podemos entender que o estado fisiológico dos animais recém-nascidos corresponde a um reflexo do estado materno, podemos supor que a atividade da via no músculo esquelético responde à regulação proporcionada pela mãe obesa.

Assim, ao confrontarmos nossos resultados com os obtidos no trabalho de Zhu *et al.* (2008), verificamos resultados conflitantes. Os autores avaliaram o efeito da obesidade materna induzida por *overfeeding* sobre o músculo esquelético de fetos de ovelhas e detectaram redução na fosforilação do mTOR, da 4E-BP1 e do resíduo de Serina 473 da Akt, que é alvo da fosforilação pelo mTOR e necessária para sua completa ativação. Nesse caso, os autores propuseram um quadro de resistência periférica à insulina e ao IGF-I, evidenciado pelo aumento das concentrações desses hormônios e pela redução da atividade da PI3K, fato que provocou a regulação negativa do mTOR.

A redução na sensibilidade periférica à insulina e ao IGF-I afeta a função do mTOR, dado que ambos representam potentes efetores positivos de sua atividade através da transdução do sinal via Akt. No contexto fisiológico, essa resistência é acompanhada por aumento nas concentrações séricas de insulina e de IGF-I, quadro desenvolvido com o propósito de manutenção da glicemia aumentada e em resposta à ausência de *feedback* regulando negativamente a sua expressão e a sua secreção em hepatócitos, miócitos e células beta pancreáticas (BACK-NIELSEN, ALFORD & HOTHER-NIELSEN, 2004).

Como já citado, não detectamos diferenças significantes sobre as concentrações de insulina e de glicose e, adicionalmente, observamos que a concentração de IGF-I esteve reduzida em resposta ao consumo materno da dieta obesogênica. Cremos em duas explicações plausíveis para essas diferenças marcantes nos resultados obtidos, sendo que a primeira refere-se

ao período de coleta das amostras e a segunda ao delineamento metodológico proposto.

No estudo de Zhu *et al.* (2008), os animais foram retirados cirurgicamente dos úteros maternos e imediatamente eutanasiados. O ambiente intrauterino apresenta constante influxo de nutrientes e metabólitos provenientes da mãe por via placentária, de modo que podemos considerar que os animais encontram-se em constante estado pós-prandial, apresentando elevadas concentrações séricas de glicose, de ácidos graxos, de aminoácidos e de hormônios anabólicos, como a insulina e o IGF-I (MURPHY *et al.*, 2006; SIBLEY, 2009; SFERRUZZI-PERRI *et al.*, 2010).

Porém, em nosso trabalho, os animais foram eutanasiados no primeiro dia de vida, com cerca de 150 minutos após o nascimento, período considerado de jejum e acompanhado de redução na glicemia, como já demonstrado por Heng & Kliegman (1990). Propomos, assim, que os animais encontravam-se em estado basal ou hipercatabólico, quadro originado pela alta taxa metabólica basal dos filhotes neonatos, o que estaria contribuindo para o mascaramento de possíveis alterações na atividade das proteínas que compõem a via do mTOR, as quais, segundo Kimball *et al.* (2000), estão reguladas negativamente no jejum do neonato. Nesse sentido, destaca-se que esse período é acompanhado por redução na energia celular livre (menores concentrações de ATP e outros compostos de alta energia), o que provoca a ativação da AMPK, efetora positiva da TSC2 através da fosforilação dos resíduos Thr1227 e Ser1345, levando à regulação negativa do mTOR (INOKI *et al.*, 2003).

Ressalta-se, ainda, o fato de que o trabalho anterior utilizava um modelo de consumo alimentar excessivo em detrimento do consumo da dieta hiperlipídica para indução da obesidade materna. Ademais, outras diferenças no delineamento experimental, como o organismo escolhido e o tempo de exposição à dieta, podem ter influenciado os resultados, contribuindo para a gênese das diferenças marcantes na caracterização do estado fisiológico dos animais nos diversos estudos. Com as diferenças metodológicas propostas, podemos entender as origens dos contrastes nos resultados apresentados entre este e trabalhos semelhantes.

Em relação aos dados aqui apresentados de fosforilação do mTOR nos músculos dos neonatos, destacamos a sua resposta à fosforilação aumentada da Akt. Independentemente da origem desse fenômeno, demonstramos que essa última tem efeito positivo sobre o mTOR no modelo estudado, como já observado em trabalhos anteriores (NAVÉ *et al.*, 1999). Porém, ressaltamos que a atividade proteína quinase do mTOR pode não ter sido aumentada, fato evidenciado pela ausência de diferença significativa entre os dois grupos sobre a fosforilação das proteínas *downstream*, 4E-BP1 e S6K1.

Durante o desenvolvimento fetal, podemos observar intenso processo de diferenciação de células precursoras em células maduras. Uma linhagem dessas células é denominada mesenquimal e compreende células pluripotentes com a habilidade de diferenciarem-se em grande variedade de tipos celulares, dentre os quais destacamos os mioblastos que, a partir de estímulos adequados, darão origem a miócitos maduros.

Trabalhos recentes ressaltam a importância biológica da atividade quinase-independente do mTOR nos mecanismos de diferenciação de células mesenquimais em miócitos. Erbay *et al.* (2001; 2003) demonstraram de forma precisa que a inativação do mTOR através do tratamento com rapamicina leva à redução da miogênese e que a sua função nesse contexto envolve múltiplos processos biológicos que não incluem a regulação da tradução de RNAm. Os autores propõem que a atividade do mTOR está, em verdade, relacionada à expressão gênica do fator de crescimento IGF-II e à posterior indução da expressão de importantes fatores relacionados à miogênese.

Assim, acreditamos que a ausência do aumento da atividade quinase do mTOR em resposta ao aumento do consumo materno de ácidos graxos saturados não exclui ações do mesmo sobre a expressão de IGF-II. Especulamos ainda que o possível aumento na expressão de IGF-II possa resultar em atividade autócrina do hormônio sobre as células do tecido muscular, resultando no aumento da fosforilação da Akt (Thr308) observado, via ativação da PI3K (ERBAY *et al.*, 2003). A ausência de análises específicas sobre a expressão e secreção de IGF-II não nos permite levantar afirmações precisas, mas, acreditamos que essa seja uma justificativa plausível para a ativação aumentada da Akt em um quadro fisiológico de baixas concentrações séricas de IGF-I e de leptina.

7.9 Dieta hiperlipídica materna no período pós gestacional afeta a fosforilação das proteínas alvo do mTOR em resposta ao consumo do leite

Já demonstramos que, quando ratas são alimentadas com uma dieta rica em ácidos graxos saturados durante a amamentação, o possível efeito provocado no leite induz alterações morfológicas no músculo esquelético, com aparente impacto no desenvolvimento tecidual. A etiologia desse fenômeno ainda não está totalmente elucidada na literatura e os autores buscam investigar alterações na expressão de diversos genes relacionados ao crescimento. Porém, até o presente momento, desconhecemos trabalhos que tenham estudado a atividade das proteínas componentes da via do mTOR nesse contexto. Como discutido anteriormente, a atividade das proteínas componentes dessa via reflete o consumo alimentar e o estado nutricional dos indivíduos, sendo altamente sensível às concentrações de hormônios e de nutrientes. Dessa forma, com relação ao estudo dos animais lactentes, acreditamos no potencial dos efeitos do leite materno e do estado nutricional sobre possíveis alterações na fosforilação dessas proteínas

Inicialmente, em contraste aos efeitos do consumo materno da dieta hiperlipídica sobre os animais neonatos, observamos redução na atividade quinase do mTOR no 21^o dia de vida dos lactentes em resposta ao consumo materno da dieta hiperlipídica na lactação. Apesar da ausência de alterações na fosforilação do próprio mTOR, detectamos efeito da dieta hiperlipídica materna pós-gestacional sobre a redução da fosforilação em resíduos específicos das proteínas alvo, caso da 4E-BP1, da S6K1 e da Akt (no resíduo Ser473). Os resultados obtidos parecem responder às alterações fisiológicas e morfológicas que provavelmente derivam das diferenças na composição do leite materno.

Cabe ressaltar que esses resultados referem-se ao período da primeira coleta de amostras, não havendo, no entanto, efeito observado após 90 minutos. O período de jejum utilizado foi escolhido com base no trabalho de Norton *et al.* (2009), no qual ratos obtinham o pico de atividade das proteínas da via do mTOR após 90 minutos do consumo de uma refeição completa,

havendo rápida redução da sua fosforilação após esse período. Nesse caso, os pesquisadores lançaram mão de um modelo com animais adultos cuja linhagem diferia da utilizada neste trabalho. A taxa metabólica basal de animais lactentes está aumentada em comparação a animais maduros, sendo que o período de 90 minutos pode configurar jejum prolongado, no qual novos efetores – dentre os quais destacamos fosfatases e outras quinases – podem participar da regulação negativa dos processos anabólicos.

Acreditamos que as alterações na composição corporal, observadas nos animais com 21 dias de idade, tenham sido determinantes para a redução na transdução do sinal da via do mTOR no nosso trabalho. Essas alterações morfológicas resultaram em um fenótipo obesogênico e acabaram por provocar distúrbios metabólicos e fisiológicos, caracterizados pela glicemia aumentada, pela possível resistência central e periférica à leptina e pelo desenvolvimento inadequado do músculo esquelético. Cabe ressaltar que o termo resistência à insulina não é adequado nesse modelo, dado que não se pode afirmar com certeza se animais nessa idade apresentam todos os sinais característicos desse distúrbio – e testes de tolerância à glicose e à insulina para o estudo de curvas glicêmicas seriam estressantes.

Propomos, no entanto que a possível redução na transdução do sinal da insulina possa levar à redução da atividade estimulatória da Akt sobre o mTOR e, conseqüentemente, da fosforilação das proteínas alvo, como o observado na redução da fosforilação da 4E-BP1, da S6K1 e do resíduo de serina 473 da Akt. Entretanto, lembramos que a redução na fosforilação do próprio mTOR e da Akt no resíduo de treonina 308 – proveniente da transdução do sinal da insulina –, não foi estatisticamente significativa e, por conta desse fato, especulamos que a redução na transmissão do sinal da insulina pode ter contribuído, mas não representou o único elemento responsável pelos efeitos observados na via do mTOR.

Nesse sentido, a inferida redução na sensibilidade à leptina pode ter representado efeito aditivo sobre a regulação da atividade do mTOR. Em tecidos periféricos que expressam o receptor Ob-Rb, a transmissão do sinal gerado pela leptina resulta na fosforilação e na inativação da AMPK, que é efetor negativo do mTOR. Se a transdução desse sinal está reduzida, o efeito final é o aumento da atividade da AMPK e a conseqüente modulação negativa

da fosforilação do mTOR. Cabe ainda ressaltar que reduções da sensibilidade hipotalâmica à leptina podem interferir na atividade da Akt no músculo esquelético, como proposto no recente estudo de Roman *et al.* (2010), que demonstrou, pela primeira vez, o potencial da ação da leptina no hipotálamo sobre o estímulo à fosforilação da Akt no músculo esquelético. Dessa forma, a possível resistência central à leptina pode configurar outro sítio de regulação, que pode ter participado na gênese dos resultados obtidos com relação à atividade da via do mTOR no músculo esquelético dos lactentes.

Com base em todos os resultados apresentados, relativos à atividade do mTOR no músculo do lactente, sugere-se que a redução da ativação observada ocorre pela ação de diversos fatores oriundos do quadro fisiológico e metabólico do modelo estudado. Em outras palavras, acreditamos que as alterações proporcionadas pelo consumo materno de ácidos graxos saturados durante a amamentação tenham sido cruciais para a alteração da sensibilidade dessa via. Acreditamos também que, dado que esse mecanismo é importante para o aumento da síntese proteica em neonatos (KIMBALL *et al.*, 2000), fato essencial para o crescimento e a divisão celulares, a redução da atividade da via do mTOR tenha sido determinante para as alterações morfológicas observadas no tecido muscular esquelético.

8. CONCLUSÕES

No presente estudo, tivemos a oportunidade de observar interessantes fenômenos relacionados à regulação metabólica e fisiológica da prole em resposta ao consumo materno da dieta hiperlipídica. Ao final do mesmo, concluímos que:

- O consumo materno de dietas ricas em ácidos graxos saturados durante os períodos gestacional e lactacional provoca alterações da atividade da via do mTOR no músculo esquelético, sendo, essa regulação, dependente da idade e do estado fisiológico desses animais.
- A possível progressão da obesidade materna durante o período gestacional resulta em aumento da fosforilação da Akt e do mTOR no músculo esquelético da prole, apesar da redução das concentrações séricas de leptina e de IGF-I.
- A dieta hiperlipídica materna pós-gestacional, em detrimento da dieta hiperlipídica gestacional, foi determinante para o desenvolvimento do fenótipo obesogênico nos lactantes, provocando aumento da massa adiposa, alterações da morfologia do tecido muscular esquelético, aumento da leptinemia e da lipidemia e redução da atividade da via do mTOR no músculo. O possível efeito observado sobre os lactentes pode refletir alterações na composição láctea de ácidos graxos.

9 REFERÊNCIAS

ADAMS, M.; MONTAGUE, C.T.; PRINS, B.; HOLDER, J.C.; SMITH, S.A.; SANDERS, L.; DIGBY, J.E.; SEWTER, C.P.; LAZAR, M.A.; CHATTERJEE, V.K.K.; O'RAHILLY, S. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. **Journal of Clinical Investigation** v.100, p.3149-53, 1997.

AGUIARI, P.; LEO, S.; ZAVAN, B.; VINDIGNI, V.; RIMESSI, A.; BIANCHI, K.; FRANZIN, C.; CORTIVO, R.; ROSSATO, M.; VETTOR, R.; ABATANGELO, G.; POZZAN, T.; PINTON, P.; RIZZUTO, R. High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.105, p.1226-31, 2008.

ALESSI, D.R.; DEAK, M.; CASAMAYOR, A.; CAUDWELL, F.B.; MORRICE, N.; NORMAN, D.G.; GAFFNEY, P.; REESE, C.B.; MACDOUGALL, C.N.; HARBISON, D.; ASHWORTH, A.; BOWNES, M. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PKD1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. **Current Biology** v.7, n.10, p.776-89, 1997.

ALMEIDA, M.; HAN, L.; MARTIN-MILLAN, M.; O'BRIEN, C.A.; MANOLAGAS, S.C. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. **Journal of Biological Chemistry** v.282, p.27298-305, 2007.

ANDERSON, S.R.; GILGE, D.A.; STEIBER, A.L.; PREVIS, S.F. Diet-induced obesity alters protein synthesis: tissue-specific effects in fasted versus fed mice. **Metabolism** v.57, p.347-54, 2008.

ANTHONY, J.C.; LANG, C.H.; CROZIER, S.J.; ANTHONY, T.G.; MacLEAN D.A.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism** v.282, p.1092-101, 2002.

ARAKI, E.; LIPES, M.A.; PATTI, M.E.; BRÜNING, J.C.; HAAG, B. 3rd; JOHNSON, R.S.; KAHN, C.R. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature** v.372, n.6502, p.186-90, 1994.

ARNITAGE, J.A.; TAYLOR, P.D.; POSTON, L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. **Journal of Physiology** v.565, p.3-8, 2005.

ATHERTON, P.J.; BABRAJ, J.A.; SMITH, K.; SINGH, J.; RENNIE, M.J.; WACKERHAGE, H. Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. **FASEB Journal** v.19, p.786-8, 2005.

AVRUCH, J.; BELHAM, C.; WENG, Q.P.; HARA, K.; YONEZAWA, K. The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational

capacity. **Progress in Molecular and Subcellular Biology** v.26 p.115-54, 2001.

BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S.; KERMORGANT, S.; LAIGNEAU, J.P.; BORTOLUZZI, M.N.; MOIZO, L.; LEHY, T.; GUERRE-MILLO, M.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; LEWIN, M.J.; The stomach is a source of leptin. **Nature** v.394, p.790-3, 1998.

BANKS, W.A.; COON, A.B.; ROBINSON, S.M.; MOINUDDIN, A.; SHULTZ, J.M.; NAKAOKE, R.; MORLEY, J.E. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. **Diabetes** v.53, p.1253-60, 2004.

BARKER, D.J. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. **Nutrition** v.13, p.807-13, 1997.

BAYOL, S.A.; JONE, D.; GOLDSPINK, G.; STICKLAND, N.C. The influence of undernutrition gestation on skeletal muscle cellularity and the expression of genes that control muscle growth. **British Journal of Nutrition** v.91, p.331-9, 2004.

BAYOL, S.A.; MACHARIA, R.; FARRINGTON, S.J.; SIMBI, B.H.; STICKLAND, N.C. Evidence that a maternal "junk food" diet during pregnancy and lactation can reduce muscle force in offspring. **European Journal of Nutrition** v.48, p.62-5, 2009.

BAYOL, S.A.; SIMBI, B.H.; STICKLAND, N.C. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. **Journal of Physiology** v.567, p.951-61, 2005.

BECK-NIELSEN, H.; ALFORD, F.; HOTHER-NIELSEN, O. Insulin resistance in glucose disposal and production in man with specific reference to metabolic syndrome and type 2 diabetes. In: KUMAR, S.; O'RAHILLY, S. eds. **Insulin Resistance – Insulin action and its disturbances in disease**. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2005. p.155-78.

BERGMEYER, H.U. Determination with glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. ed. **Methods of enzymatic analysis** 2.ed. Weinheim: Verlag Chemie; New York: Academic Press, 1974. p.1205-12.

BI, S.; GAVRILOVA, O.; GONG, D.W.; MASON, M.M.; REITMAN, M. Identification of a placental enhancer for the human leptin gene. **Journal of Biological Chemistry** v.272, p.30583-8, 1997.

BOUZAKRI, K.; ZIERATH, J.R. MAPK4K4 gene silencing in human skeletal muscle prevents tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry** v.282, n.11, p.7783-9, 2007.

BRØNS, C.; JACOBSEN, S.; NILSON, E.; RÖNN, T.; JENSEN, C.B.; STORGAARD, H.; POULSEN, P.; GROOP, L.; LING, C.; ASTRUP, A.; VAAG, A. Deoxyribonucleic acid methylation and gene expression of PPARGC1A in human muscle is influenced by high-fat overfeeding in a birth-weight-

dependent manner. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v.95, n.6, p.3048-56, 2010.

BROWN, E.J.; ALBERS, M.W.; SHIN, T.B.; ISHIKAWA, K.; KEITH, C.T.; LANE, W.S.; SHREIBER, S.L. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. **Nature** v. 369, p. 756-8, 1994.

BROWN, J.L.; SPICER, M.T.; SPICER, L.J. Effect of high-fat diet on body composition and hormone response to glucose tolerance test. **Endocrine** v.19, p.327-32, 2002.

BUCKLEY, A.J.; KESERÜ, B.; BRIODY, J.; THOMPSON, M.; OZANNE, S.E.; THOMPSON, C.H. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. **Metabolism** v.54, p.500-7, 2005.

BUE, J.M.; HAUSMAN, D.B.; BERDANIER, C. Gestational diabetes in the BHE rat: Influence of dietary fat. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.161, p.234-40, 1989.

CHALKLEY, S.M.; HETTIARACHI, M.; CHISHOLM, D.J.; KRAEGEN, E.W. Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism** v.282, p.1231-8, 2002.

CHAVEZ, J.A.; SUMMERS, S.A. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.419 p.101-9, 2003.

CHEATHAM, B.; VLAHOS, C.J.; CHEATHAM, L.; WANG, L.; BLENIS, J.; KAHN, C.R. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. **Molecular and Cellular Biology** v.14 p.4902-11,1994.

CHEN, H.; SIMAR, D.; LAMBERT, K.; MERCIER, J.; MORRIS, M.J. Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. **Endocrinology** v.149, p.5348-56, 2008.

CHIU, M.I.; KATZ, H.; BERLIN, V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast TOR, interacts with the FKBP12/Rapamycin complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.91, p.12574-8, 1994.

CHU, N.F.; RIMM, E.B.; WANQ, D.J.; LIOU, H.S.; SHIEH, S.M. Clustering of cardiovascular disease risk factors among obese schoolchildren: the Taipei Children Heart Study. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.67, p.1141-6, 1998.

COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; ROTNITZKY, A.; MANSON, J. E. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. **Annals of Internal Medicine** v.122, n.7, p.481-486, 1995.

CURHAN, G.C.; WILLETT, W.C.; RIMM, E.B.; SPIEGELMAN, D.; ASCHERIO,

A.L.; STAMPFER, M.J. Birth weight and adult hypertension and obesity in women. **Circulation** v.94, p.1310-15, 1996.

DeFRONZO, R.A.; BINDER, C.; WAHREN, J.; FELIG, P.; FERRANNINI, E.; FABER, O.K. Sensitivity of insulin secretion to feedback inhibition by hyperinsulinaemia. **Acta Endocrinologica** v.98, n.1, p.81-6, 1981.

DEL PRADO, M.; DELGADO, G.; VILLALPANDO, S. Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters Milk composition and production and litter growth in rats. **Journal of Nutrition** v.127, p.458-62, 1997.

DEL PRADO, M.; VILLALPANDO, S.; GORDILLO, J.; HERNANDEZ-MONTES, H. A high dietary lipid Intake during pregnancy and lactation enhances mammary gland lipid uptake and lipoprotein lipase activity in rats. **Journal of Nutrition** v.129, 1574-8, 1999.

DENNIS, P.B.; JAESCHKE, A.; SAITOH, M.; FOWLER, B.; KOZMA, S.C.; THOMAS, G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. **Science** v.294, p.1102-5, 2001.

DORRELLO, N. V.; PESCHIAROLI, A.; GUARDAVACCARO, D.; COLBURN, N.H.; SHERMAN, N.E.; PAGANO, M. S6K1- and β TRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. **Science** v.314, p.467-471, 2006.

DU, M.; YAN, X.; TONG, J.F.; ZHAO, J.;ZHU, M.J. Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. **Biology of Reproduction** v. 82, p.4-12, 2010.

DYRSKOG, S.E.U; GREGERSEN, S.; HERMANSEN, K. High-fat feeding during gestation and nursing period have differential effects on the insulin secretory capacity in offspring from normal wistar rats. **The Review of Diabetic Studies** v.2, n.3, p.136-45, 2005.

ERBAY, E.; CHEN, J. The mammalian target of rapamycin regulates c2c12 myogenesis via a kinase-independent mechanism. **Journal of Biological Chemistry** v.276, n.39, p.36079-82, 2001.

ERBAY, E.; PARK, I.H.; NUZZI P.D.; SHOENHERR, C.J.; CHEN, J. IGF-II transcription in skeletal myogenesis is controlled by mTOR and nutrients. **Journal of Cell Biology** v. 163, n.5, p.931-6, 2003.

ERIKSSON, J.G.; YLIHARSILA, H.; FORSEN, T.; OSMOND, C.; BARKER, D.J. Exercise protects against glucose intolerance in individuals with a small body size at birth. **Preventive Medicine** v.39, p.164-7, 2004.

ESCOBAR, J.; FRANK, J.W.; SURYAWAN, A.; NGUYEN, H.V.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S.; DAVIS, T.A. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism** v.290, p.E612-E621, 2006.

ESCOBAR, J.; FRANK, J.W.; SURYAWAN, A.; NGUYEN, H.V.; van HORN, C.G.; HUTSON, S.S.; DAVIS, T.A. Leucine and α -ketoisocaproic acid, but not norleucine, stimulate skeletal muscle protein synthesis in neonatal pigs. **Journal of Nutrition** v.140, p.1418-24, 2010.

ESSERS, M.A.; DE VRIES-SMITS, L.M.; BARKER, N.; POLDERMAN, P.E.; BURGERING, B.M.; KORSWAGEN, H.C. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. **Science** v.308, p.1181-4, 2005.

FAM, B.C.; MORRIS, M.J.; HANSEN, M.J.; KEBEDE, M.; ANDRIKOPOULOS, S.; PROIETTO, J.; THORBURN, A.W. Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism** v.9, n.6, p.840-52, 2007.

FELIG, P.; WAHREN, J.; HENDLER, R.; BRUNDIN, T. Splanchnic glucose and amino acid metabolism in obesity. **Journal of Clinical Investigation** v.53, p.582-90, 1974.

FÉRÉZOU-VIALA, J.; ROY, A.F.; SÉROUGNE, C.; GRIPOIS, D.; PARQUET, M.; BAILLEUX, V.; GERTLER, A.; DELPLANQUE, B.; DJIANE, J.; RIOTTOT, M.; TAOUIS, M. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v.293, p.1056-62, 2007.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.C.; LIMA, F.B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria** v.83, p.192-203, 2007.

FORSEN, T.; ERIKSSON, J.; TUOMILEHTO, J.; REUNANEN, A.; OSMOND, C.; BARKER, D. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. **Annals of Internal Medicine** v.133, p.176-82, 2000.

FRANGIOUDAKIS, G.; YE, J.M.; COONEY, G.J. Both saturated and n-6 polyunsaturated fat diets reduce phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and protein kinase B in muscle during the initial stages of in vivo insulin stimulation. **Endocrinology** v.146, p.5596-603, 2005.

FRUCHART, J.C.; STAELS, B.; DURIEZ, P. PPARs, metabolic disease and atherosclerosis. **Pharmacological Research** v.44, n.5, p.345-52, 2001.

GAO, X.; PAN, D. TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. **Genes Development** v.15, p.1383-92, 2001.

GIL, A.; AGUILERA, C.M.; GIL-CAMPOS, M.; CANETE, R. Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. **British Journal of Nutrition** v.98, p.121-6, 2007.

GINGRAS, A.C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annual Review of Biochemistry** v.68, p.913-63, 1999.

GLEASON, C.E.; LU, D.; WITTERS, L.A.; NEWGARD, C.B.; BIRNBAUM, M.J. The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic beta-cells. **Journal of Biological Chemistry** v.282, n.14, p.10341-51, 2007.

GRIFFIN, M. E.; MARCUCCI, M. J.; CLINE, G. W.; BELL, K.; BARUCCI, N.; LEE, D.; GOODYEAR, L. J.; KRAEGEN, E. W.; WHITE, M. F.; SHULMAN, G. I. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. **Diabetes** v.48, n.6, p.1270-4, 1999.

GUO, F.; JEN, K.L.C. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. **Physiology & Behavior** v.57, n.4, p.681-6, 1995.

HAAR, V.E.; LEE, S.I.; BANDHAKAVI, S.; GRIFFIN, T.J.; KIM, D.H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. **Nature Cell Biology** v.9, p.316-23, 2007.

HACHEY, D.L.; SILBER, G.H.; WONG, G.H.; GARZA, C. Human lactation II. Endogenous fatty acid synthesis by the mammary gland. **Pediatric Research** v.25, p.63-8, 1989.

HARA, K.; MARUKI, Y.; LONG, X.; YOSHINO, K.; OSHIRO, N.; HIDAYAT, S.; TOKUNAGA, C.; AVRUCH, J.; YONEZAWA, K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. **Cell** v.110, n.2, p.177-89, 2002.

HAUSMAN, D.B.; MCCLOSKEY, H.M.; MARTIN, R.J. Maternal dietary fat type influences the growth and fatty acid composition of newborn and weanling rats. **Journal of Nutrition** v.121, p.1917-23, 1991.

HECHT, A.; KEMLER, R. Curbing the nuclear activities of beta-catenin. Control over Wnt target gene expression. **EMBO Reports** v.1, p.24-8, 2000.

HEDLEY, A.A.; OGDEN, C.L.; JOHNSON, C.L.; CARROLL, M.D.; CURTIN, L.R.; FLEGAL, K.M. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. **Journal of the American Medical Association** v. 291, p. 2847-50, 2004.

HEGARTY, B.D.; FURLER, S.M.; YE, J.; COONEY, G.J.; KRAEGEN, E.W. The role of intramuscular lipid in insulin resistance. **Acta Physiologica Scandandinavica** v.178, n.4, p.373-83, 2003.

HENG, J.; KLIEGMAN, R.M. Effects of maternal obesity on fasting metabolism in newborn rats. **International Journal of Obesity** v.14, n.6 p.505-13, 1990.

HIRASHIMA, Y.; TSURUZOE, K.; KODAMA, S.; IGATA, M.; TOYONAGA, T.; UEKI, K.; KAHN, C.R.; ARAKI, E. Insulin down-regulates insulin receptor substrate-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. **Journal of Endocrinology** v.179, n.2, p.253-66, 2003.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GÖRGÜN, C.G.; UYSAL, K.T.; MAEDA, K.; KARIN, M.; HOTAMISLIGIL, G.S. A central role for JNK in obesity

and insulin resistance. **Nature** v.420, p.333-6, 2002.

HOGGARD, N.; HUNTER, L.; DUNCAN, J.S.; WILLIAMS, L.M.; TRAYHURN, P.; MERCER, J.G. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.94, p.11073-8, 1997.

INOKI, K.; ZHU, T.; GUAN, K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. **Cell** v.115, p.577-90, 2003.

ITAU, S.; RUDERMAN, N.R.; SCHMEIDER, F.; BODEN, G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C and I κ B- α . **Diabetes** v.51, p.2205-11, 2002.

JENSEN, M.D.; HAYMOND, M.W. Protein metabolism in obesity: effects of body fat distribution and hyperinsulinemia on leucine turnover. **American Journal of Clinical Nutrition** v.53, p.172-6, 1991.

JENSEN, R.G. Lipids in human milk. **Lipids** v.34 n.12, p.1243-71, 1999.

KHAMZINA, L.; VEILLEUX, A.; BERGERON, S.; MARETTE, A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. **Endocrinology** v.146, n.3, p.1473-81, 2005.

KHAN, I.Y.; DEKOU, V.; DOUGLAS, G.; JENSEN, R.; HANSON, M.A.; POSTON, L.; TAYLOR, P.D. A high fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v.288, p.127-33, 2004.

KIM, D.H.; SABATINI, D.M. Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. **Current Topics in Microbiology and Immunology** v.279, p.259-70, 2004.

KIM, D.H.; SARBASSOV, D.D.; ALI, S.M.; KING, J.E.; LATEK, R.R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; SABATINI, D.M. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. **Cell** v.110, n.2, p.163-75, 2002.

KIM, D.H.; SARBASSOV, D.D.; ALI, S.M.; LATEK, R.R.; GUNTUR, K.V.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; SABATINI, D.M. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. **Molecular Cell** v.11, n.4, p.895-904, 2003.

KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S.; NGUYEN, H.V.; SURYAWAN, A.; BUSH, J.A.; DAVIS, T.A. Feeding stimulates protein synthesis in muscle and liver of neonatal pigs through an mTOR-dependent process. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**. v.279, p.1080-7, 2000.

KLIEWER, S.A.; XU, E.; LAMBERT, M.H.; WILLSON, T.M. Peroxisome proliferator activated receptors: from genes to physiology. **Recent Progress in Hormone Research** v.56, p.239-63, 2001.

KOOPMAN, R.; VERDIJK, L.; MANDERS, R.J.F.; GIJSEN, A.P.; GORSELINK, M.; PIJPERS, E.; WAGENMAKERS, A.J.M.; van LOON, L.J.C. Co-ingestion of protein and leucine stimulates muscle protein synthesis rates to the same extent in young and elderly lean men. **American Journal of Clinical Nutrition** v.84, p.623-32, 2006.

KUSHI, L.H.; LEW, R.A.; STARE, F.J.; ELLISON, C.R.; el LOZI, M.; BOURKE, G.; DALY, L.; GRAHAM, I.; HICKEY, N.; MULCAHY, R. Diet and 20-year mortality from coronary heart disease. The Ireland-Boston Diet-Heart Study. **New England Journal of Medicine** v.312, p.811-8, 1985.

LEE, J.S.; PINNAMANENI, S.K.; EO, S.J.; CHO, I.H.; PYO, J.H.; KIM, C.K.; SINCLAIR, A.J.; FEBBRAIO, M.A.; WATT, M.J. Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. **Journal of Applied Physiology** v.100, n.1467-74, 2006.

LEE, Y.H.; GIRAUD, J.; DAVIS, R.J.; WHITE, M.F. c-JUN N-terminal Kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. **Journal of Biological Chemistry** v.278, p.2896-902, 2003.

LEE, Y.H.; NAIR, S.; ROUSSEAU, E.; ALLISON, D.B.; PAGE, G.P.; TATARANNI, P.A.; BOGARDUS, C.; PERMANA, P.A. Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes. **Diabetologia** v.48, p.1776-83, 2005.

LEONARD, N.R.; BERTHOUD, H.R. Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: Pathways and genes. **Obesity** v.16 p.S11-S22, 2008.

LEWIS, G.F.; CARPENTIER, A.; ADELI, K.; GIACCA, A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Endocrine Review** v.23, p.201-29, 2002.

LONG, X.; ORTIZ-VEGA, S.; LIN, Y.; AVRUCH, J. Rheb binding to mTOR is regulated by amino acid sufficiency. **Journal of Biology Chemistry** v.280, p.23433-6, 2005.

LONG, Y.C.; ZIERATH, J.R. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. **Journal of Clinical Investigation** v.116, n.7, p.1776-83, 2006.

LOVEJOY, J.; DIGIROLAMO, M. Habitual dietary intake and insulin sensitivity in and obese adults. **American Journal of Clinical Nutrition** v.55, p.174-9, 1992.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Foundation Symposium** v.156, p.38-55, 1991.

LUMENG, C.N.; DEYOUNG, S.M.; BODZIN, J.L.; SALTIEL, A.R. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. **Diabetes** v.56, p.16-23, 2007.

MA, X.M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** v.10, p.307-18, 2009.

MAFFEIS, C.; MICCIOLO, R.; MUST, A.; ZAFFANELLO, M.; PINELLI, L. Parental and perinatal factors associated with childhood obesity in Northeast Italy. **International Journal of Obesity** v.18, p.301-5, 1994.

MAGAREY, A.M.; DANIELS, L.A.; BOULTON, T.J.; COCKINGTON, R.A. Predicting obesity in early adulthood from childhood and parental obesity. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders** v.27, p.505-13, 2003.

MALLINSON, J.E.; SULLEY, D.V.; CRAIGON, J.; PLANT, R.; LANGLEY-EVANS, S.C.; BRAMELD, J.M. Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. **British Journal of Nutrition** v.98, p.292-9, 2007.

MARTIN, D.E.; HALL, M.N. The expanding TOR signaling network. **Current Opinion in Cell Biology** v.2, p.158-66, 2005.

MARTIN, K.A.; BLENIS, J. Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways. **Advances in Cancer Research**. v.86, p.1-39, 2002.

MCMANAMAN, J.L.; NEVILLE M.C. Mammary physiology and milk secretion. **Advanced Drug Delivery Review**. v.55, n.5, p.629-41, 2003.

MONTEIRO, C.A.; CONDE, W.L.; POPKIN, B.M. Is obesity replacing or adding to undernutrition? Evidence from different social classes in Brazil. **Public Health Nutrition** v.5 n.1A, p.105-12, 2002.

MORIN, C. L.; PAGLIASSOTTI, M. J.; WINDMILLER, D.; ECKEL, R. H. Adipose tissue-derived tumor necrosis factor-alpha activity is elevated in older rats. **Journal of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences** v.52, n.4, p.190-5, 1997.

MORRIS, M.J; CHEN, H. Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth. **International Journal of Obesity** v.33, n.1, p.115-22, 2009.

MURPHY, V.E.; SMITH, R.; GILES, W.B.; CLIFTON, V.L. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. **Endocrinology Reviews** v.27, n.2, p.141-69, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of the laboratory rat. In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of laboratory animals** 4.ed; Washington, D.C.: National Academy Press, 1995. p.11-79.

NADERALI, E.K.; PICKAVANCE, L.C.; WILDING, J.P.; WILLIAMS, G. Diet induced dysfunction in the rat is dependent of the degree of increase in total body weight. **Clinical Science** v.100, p.635-41, 2001.

NAVÉ, B.T.; OUWENS, D.M.; WITHERS, D.J.; ALESSI, D.R.; SHEPHERD, P.R. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. **Biochemistry Journal** v.344, p.427-31, 1999.

NGUYEN, M.T.A.; SATOH, H.; FAVELIUKIS, S.; BABENDURE, J.L.; IMAMURA, T.; SBODIO, J.I.; ZALEVSKY, J.; DAHIYAT, B.I.; CHI, N.W.; OLEFSKY, J.M. JNK and tumor necrosis- α mediate free fatty acid induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Biological Chemistry** v.280, n.42, p.35361-71, 2005.

NIETO-VASQUEZ, I.; FERNÁNDEZ-VELEDO, S.; KRÄMER, D.; VILABEDMAR, R. GARCIA-GUERRA, L.; LORENZO, M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. **Archives of Physiology and Biochemistry** v.114, n.3, p.183-94, 2008.

NOJIMA, H.; TOKUNAGA, C.; EGUCHI, S.; OSHIRO, N.; HIDAYAT, S.; YOSHINO, K.; HARA, K.; TANAKA, N.; AVRUCH, J.; YONEZAWA, K. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. **Journal of Biology Chemistry** v.278, p.15461-4, 2003.

NORTON, L.E.; LAYMAN, D.K.; BUNPO, P.; ANTHONY, T.G.; BRANA, D.V.; GARLICK, P.J. The Leucine Content of a Complete Meal Directs Peak Activation but Not Duration of Skeletal Muscle Protein Synthesis and Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Rats. **Journal of Nutrition** v.139, p.1103-9, 2009.

NORTON, L.E.; LAYMAN, D.K. Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. **Journal of Nutrition** v.136, n.2, p.533-7, 2006.

ODAKA, Y.; NAKANO, M.; TANAKA, T.; KABURAGI, T.; YOSHINO, H.; SATO-MITO, N.; SATO, K. The influence of a high-fat dietary environment in the fetal period on postnatal metabolic and immune function. **Obesity** v.18, n.9, p.1688-1694, 2010.

OH, K.; HU, F.B.; MANSON, J.E.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women: 20 years of follow-up of the nurses' health study. **American Journal of Epidemiology** v.161, p.672-9, 2005.

OLAUSSON, H.; SOHLSTRÖM, A. Effects of food restriction and pregnancy on the expression of insulin-like growth factors-I and -II in tissues from guinea pigs. **Journal of Endocrinology** v.179, p.437-45, 2003.

OSTROVSKY, O.; BENGAL, E.; ARONHEIM, A. Induction of terminal differentiation by the c-Jun dimerization protein JDP2 in C2 myoblasts and rhabdomyosarcoma cells. **Journal of Biological Chemistry** v.277 p.40043-54, 2002.

PEKALA, P.; KAWAKAMI, M.; VINE, W.; LANE, M. D.; CERAMI, A. Studies of insulin resistance in adipocytes induced by macrophage mediator. **Journal of Experimental Medicine** v.157, n.4, p.1360-5, 1983.

PICCIANO, M.F.; MCDONALD, S.S. Lactation. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. eds. **Modern Nutrition in Health and Nutrition** 10 ed. Baltimore:Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p.784-96.

PIETINEN, P.; ASCHERIO, A.; KORHONEN, P.; HARTMAN, A.M.; WILLET, W.C.; ALBANES, D.; VIRTAMO, J. Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. **American Journal of Epidemiology** v.145, p.876-87, 1997.

PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; RAKE, A.; WAAS, T.; MELCHIOR, K.; ZISKA, T.; ROHDE, W.; DORNER, G. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. **Journal of Neuroendocrinology** v.11, p541-546, 1999.

PLAGEMANN, A. Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. **Physiological Behavior** v.86, p.661-8, 2005.

POPKIN, B.M.; PAERATAKUL, S.; ZHAI, F.; GE, K. Dietary and environmental correlates of obesity in a population study in China. **Obesity Research** v.3, p.135-43, 1995.

POTTER, C.J.; PEDRAZA, L.G.; XU, T. Akt regulates growth by directly phosphorylating TSC2. **Nature Cell Biology** v.4, p.658-65, 2002.

PROUD, C.G. mTOR-mediated regulation of translational factors by amino acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.313, p.429-36, 2004.

RABINOWITZ, D.; ZIERLER, K. L. Forearm metabolism in obesity and its response to intra-arterial insulin. Characterization of insulin resistance and evidence for adaptive hyperinsulinism. **Journal of Clinical Investigation** v.41, p.2173-81, 1962.

RAUGHT, B. PEIRETTI, F.; GINGRAS, A.C.; LIVINGSTONE, M.; SHAHBAZIAN, D.; MAYEUR, G.L.; POLAKIEWICZ, R.D.; SONENBERG, N.; HERSHEY, J.W. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. **EMBO Journal** v.23, p.1761-69, 2004.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc

writing committee and the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition** v.123, p.1939-51, 1993.

RIVAS, D.A.; LESSARD, S.J. COFFEY, V.G. mTOR function in skeletal muscle: a focal point for overnutrition and exercise. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism** v.34, p. 807-16, 2009.

ROLLS, B.J.; ROWE, E.A. Pregnancy and lactation in the obese rats: Effects on maternal and pup weights. **Physiology and Behavior** v.28, p.393-400, 1982.

ROZEN, F.; EDERY, I.; MEEROVITCH, K.; DEVER, T.E.; MERRICK, W.C.; SONENBERG, N. Bidirectional RNA helicase activity of eukaryotic translation initiation factors 4A and 4F. **Molecular Cell Biology** v.10, p.1134-44, 1990.

SABATINI, D.M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; LUI, M.; TEMPST, P.; SNYDER, S.H. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. **Cell** v.78, n.1, p.35-43, 1994.

SARBASSOV, D.D.; GUERTIN, D.A.; ALI, S.M.; SABATINI, D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science** v.307, p.1098-101, 2005.

SCHMIDT, I.; FRITZ, A.; SCHOLCH, C.; SCHNEIDER, D.; SIMON, E.; PLAGEMANN, A. The effect of leptin treatment on the development of obesity in ocerfed suckling Wistar rats. **International Journal of Obesity and Related Metabolism Disorders** v.25, n.1168-74, 2001.

SFERRUZZI-PERRI, A.N.; OWENS, J.A.; PRINGLE, K.G.; ROBERTS, C.T. The neglected role of insulin-like growth factors in the maternal circulation regulating fetal growth. **Journal of Physiology** in press.

SHARMA, A.M.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and adipose tissue-understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v.92, p.386-95, 2007.

SIBLEY, C.P. Understanding placental nutrient transfer – why bother? New biomarkers of fetal growth. **Journal of Physiology** v.587, 3431-40, 2009.

SICHIERI, R. Dietary patterns and their associations with obesity in the brazilian city of Rio de Janeiro. **Obesity Research**, v.10, p.42-8, 2002.

SIEGA-RIZ, A.M.; LARAIA, B. The implications of maternal overweight and obesity on the course of pregnancy and birth outcomes. **Maternal and Child Health Journal** v.10, p.153-6, 2006.

SILVA, R.C.; GIOIELLI, L.A. Propriedades físicas de lipídeos estruturados obtidos a partir de banha e óleo de soja. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v.42, n.2, 223-35, 2006.

SITNICK, M.; BODINE, S.C.; RUTLEDGE, J.C. Chronic high fat feeding attenuates load-induced hypertrophy in mice. **Journal of Physiology** v.587, n.23, p.5753-65, 2009.

SMITH, J.T.; WADDELL, B.J. Leptin distribution and metabolism in the pregnant rat: transplacental leptin passage increases in late gestation but is reduced by excess glucocorticoids. **Endocrinology** v.144, p.3024-30, 2003.

SONENBERG N. mRNA 59 Cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. In: HERSHEY JWB, MATTHEWS MB, SONENBERG N. **Translational Control**. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1996.

STEINBERG, G.R.; MICHELL, B.J.; van DENDEREN, B.J.; WATT, M.J.; CAREY, A.L.; FAM, B.C.; ANDRIKOPOULOS, S.; PROIETTO, J.; GORGUN, C.Z.; CARLING, D.; HOTAMISLIGIL, G.S.; FEBBRAIO, M.A.; KAY, T.W.; KEMP, B.E. Tumor necrosis factor α -induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. **Cellular Metabolism** v.4, p.465-74, 2006.

STICKLAND, N.C. A quantitative study of muscle development in the bovine foetus (*Bos indicus*). **Anatomia, Histologia, Embryologia** v.7, p.193-205, 1978.

STIPANUK, M.H. Leucine and protein synthesis: mTOR and beyond. **Nutrition Reviews** v.65, n.3, p.122-29, 2007.

TAMASHIRO, K.L.; MORAN, T.H. Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. **Physiology and Behavior** v.100, n.5, p.560-6, 2010.

TANAKA, E.; SANO, R.; KAWAI, N.; LANGERBACH, G.E.J.; BRUGMAN, P.; TANNE, K.; van EIDJEN, T.M.G.J. Effect of food consistency on the degree of mineralization in the rat mandible. **Annals of Biomedical Engineering** v.35, n.9, p.1617-21, 2007.

TANAKA, T.; MATSUZAKI, A.; KUROMARU, R.; KINUZAWA, N.; NOSE, Y.; MATSUMOTO, T.; HARA, T. Association between birthweight and body mass index at 3 years of age. **Pediatrics International** v.43 p.641-6, 2001.

TANIGUSHI, C.M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C.R. Critical nodes in insulin action. **Nature reviews - Molecular Cell Biology** v.7, p.85-96, 2008.

TAPON, N.; ITO, N.; DICKSON, B.J.; TREISMAN, J.E.; HARIHARAN, I.K. The *Drosophila* tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. **Cell** v.105, n.3, p.345-55, 2001.

TAYLOR, P.D.; POSTON, L. Developmental programming of obesity in mammals. **Experimental Physiology** v.92, p.287-98, 2007.

TENE, C.E.; ESPINOZA-MEIJA, M.Y.; SILVA-ROSALES, N.A.; GIRÓN-CARRILLO, J.L. High birth weight as a risk factor for childhood obesity. **Gaceta Médica de México** v.139, p.15-20, 2003.

TONG, J.; ZHU, M.J.; UNDERWOOD, K.R.; HESS, B.W.; FORD, S.P.; DU, M. AMP activated protein kinase and adipogenesis in sheep fetal skeletal muscle and 3T3-L1 cells. **Journal of Animal Science** v.86 p.1296-305, 2008.

TONG, J.F.; YANG, X.; ZHU, M.J.; FORD, S.P.; NATHANIELSZ, P.W.; DU, M. Maternal obesity downregulates myogenesis and b-catenin signaling in fetal skeletal muscle. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism** v.296, p.917-24, 2009.

TUCKER, L.A.; SELJAAS, G.T.; HAGER, R.L. Body fat percentage of children varies according to their diet composition. **Journal of American Dietetic Association** v.97, p.981-6, 1997.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.; GORDON, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature** v.444, p.1027-31, 2006.

URUSHAYAMA, T.; AKUTSU, S.; MIYAZAKI, J.I.; FUKUI, T.; DIEKWISCH, T.G.H.; YAMANE, A. Change from a hard to soft diet alters the expression of insulin-like growth factors, their receptors, and binding proteins in association with atrophy in adult mouse masseter muscle. **Cell & Tissue Research** v.315, n.1, 97-105, 2003.

VARY, T.C. Acute oral leucine administration stimulates protein synthesis during chronic sepsis through enhanced association of eukaryotic initiation factor 4G with eukaryotic initiation 4E in rats. **Journal of Nutrition** v.137, p. 2074-9, 2007.

VAN DEN BERG, S.A.A.; GUIGAS, B.; BIJLAND, S.; OUWENS, M.; VOSHOL, P.J.; FRANTS, R.R.; HAVEKES L.M.; ROMIJN, J.A.; van DIJK, K.W. High levels of dietary stearate promote adiposity and deteriorate hepatic insulin sensitivity. **Nutrition and Metabolism** v.7, n.24, p.1-11, 2010.

VICKERS, M.H.; IKENASIO, B.A.; BREIER, B.H. IGF-I Treatment reduces hyperphagia, obesity and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming. **Endocrinology** v.142, p.3964-73, 2001.

WANG, L.; HARRIS, T.E.; LAWRENCE, J.C.Jr. Regulation of proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) function by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-mediated phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**. 283, 15619-27, 2008.

WEI, Y.; CHEN, K.; WHALEY-CONNELL, A.T.; STUMP, C.S.; IBDAH, J.A.; SOWERS, J.R. Skeletal muscle insulin resistance: role of cytokines and reactive oxygen species. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v.294, p.673-80, 2008.

WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R.L.; FERRANTE Jr, A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation** v.112, p.1796-808, 2003.

WHITE, M.F. Insulin signalling in health and disease. **Science** v.302, p.1710-11, 2003.

WILLIAMSON, D.H.; LUND, P. Strategies for the supply of lipid substrates during post-natal brain development: a tale of two tissues. **Developmental Neuroscience** v.15, n.3, p.156-64, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Childhood overweight and obesity** [texto na internet]. Geneva, 2009 [acesso em 9 mai 2010]. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diet, Nutrition and the prevention of chronic diseases. **World Health Organization Technical Report Series** v.916, p.1-149, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity and overweight** [texto na internet]. Geneva, 2006 [acesso em 14 fev 2008]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>

XU, J.; EILAT-AIDAR, S.; LORIA, C.; GOLDBOURT, C.; HOWARD, B.V.; FABSITZ, R.R.; ZEPHIER, E.M.; MATTIL, C.; LEE, E.T. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease: the Strong Heart Study. **American Journal of Clinical Nutrition** v.84, p.894-902, 2006.

YAMAGUCHI, T.; TOBE, K.; TAMEMOTO, H.; UEKI, K.; KABURAGI, Y.; YAMAMOTO-HONDA, R.; TAKAHASHI, Y.; YOSHIZAWA, F.; AIZAWA, S.; AKANUMA, Y. Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology** v.16, p.3074-84, 1996.

YAMAGUCHI, R.; NAKAGAWA, Y.; LIU, Y.J.; FUJISAWA, Y.; SAI, S.; NAGATA, E.; SANO, S.; SATAKE, E.; MATSUSHITA, R.; NAKANISHI, T.; CHAPMAN, K.E.; SECKL, J.R.; OHZEKI, T. Effects of maternal high-fat diet on serum lipid concentration and expression of peroxisomal proliferator-activated receptors in the early life of rat offspring. **Hormone and Metabolic Research** v.42, n.11, p.821-5, 2010.

YANG, H.S.; JANSEN, A.P.; KOMAR, A.A.; ZHENG, X.; MERRICK, W.C.; COSTES, S.; LOCKETT, S.J.; SONENBERG, N.; COLBURN, N.H. The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. **Molecular and Cellular Biology** v.23, 26-37, 2003.

ZHANG, J.; ZHANG, F.; DIDELOT, X.; BRUCE, K.D.; CAGAMPANG, F.R.; VATISH, M.; HANSON, M.; LEHNERT, H.; CERIELLO, A.; BYRNE, C.D. Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. **BMC Genomics** v.10, p.478-89, 2009.

ZHU, M.J.; HAN, B.; TONG, J.; MA, C.; KIMZEY, J.M.; UNDERWOOD, K.R.; XIAO, Y.; HESS, B.W.; FORD, S.P.; NATHANIELSZ, P.W.; DU, M. AMP-activated protein kinase signalling pathways are down regulated and skeletal muscle impaired in fetuses of obese, over-nourished sheep. **Journal of Physiology** v.586, n.10, p.2651-64, 2008.

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](#)