

# EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA FETAL/NEONATAL SOBRE A AÇÃO DA INSULINA E A HOMEOSTASE GLICÊMICA NA VIDA ADULTA

Originals



PATRICIA BERBEL LEME DE ALMEIDA<sup>1</sup>  
MARIA ALICE ROSTOM DE MELLO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduação - Universidade Estadual de Londrina-PR

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista – UNESP/Rio Claro

## Resumo

### Palavras-Chave

Desnutrição protéica, Recuperação nutricional, Insulina, Glicose e Músculo esquelético.

O presente estudo foi delineado para avaliar os efeitos imediatos e tardios da restrição protéica durante a vida fetal e neonatal sobre a ação periférica da insulina em ratos. Ratas grávidas da linhagem Wistar foram alimentadas, durante a gravidez e a lactação, com dietas isocalóricas hipoprotéica (6% de proteína) e normoprotéica (17% de proteína), servidas à vontade. As crias do sexo masculino foram avaliadas ao desmame (21 dias) e aos 90 dias. A partir daí, todos os animais passaram a receber a dieta normoprotéica. Ao desmame, os animais hipoprotéicos apresentaram peso corporal e teores séricos de glicose e de insulina significativamente menores em relação aos normoprotéicos. A taxa de remoção de glicose após administração de insulina exógena (Kitt) foi significativamente superior nos animais hipoprotéicos em relação aos normoprotéicos. A captação e oxidação de glicose pelo músculo sóleo isolado estimuladas pela insulina não foram diferentes entre os animais dos dois grupos. Na idade adulta, os teores séricos de glicose, insulina e os valores de Kitt foram semelhantes nos animais de ambos os grupos, assim como a captação e a oxidação de glicose pelo músculo sóleo isolado. Por outro lado, quando submetidos aos estresses de jejum de 48 horas e exercício agudo, os animais hipo/normoprotéicos reduziram a captação e oxidação de glicose, fato este não observado entre os normoprotéicos. Esses resultados sugerem que o metabolismo glicídico dos animais possa estar restabelecido na ausência de fatores estressantes. A incapacidade em responder adequadamente a diferentes estresses pode levar à intolerância à glicose.

## Abstract

### Keywords

Protein malnutrition, Nutritional recuperation, Insulin, Glucose, Muscle

## EFFECTS OF FETAL/NEONATAL PROTEIN RESTRICTION ON INSULIN ACTION AND GLUCOSE HOMEOSTASIS LATER IN LIFE

The present study designed to test the hypothesis that poor fetal-neonatal nutrition predisposes adult animals to glucose homeostasis perturbations or diabetes. Pregnant and lactating rats were fed an isocaloric low (6%) protein diet or a normal (17%) protein diet. The male offspring were tested at weaning (21 days) and in the adult age (90 days). From weaning on all animals were fed the normal protein diet. At weaning the offspring born to low protein-fed dams had lower body weight, serum glucose and insulin, but higher glucose disappearance rates after exogenous insulin administration (Kitt) than normal protein rats. The serum insulin-stimulated glucose uptake and oxidation by soleous muscle were not different from normal protein. At the adult age, despite of the lower weight, the offspring born to low protein-fed dams showed serum glucose, serum insulin and Kitt similar to the normal protein offspring. Soleous muscle glucose uptake and oxidation did not differ from normal protein rats. On the other hand, when submitted to 48 hours fast or acute exercise the protein restricted offspring showed reduced muscle glucose uptake and oxidation. These results indicate that poor fetal neonatal nutrition leads to adaptations which enable the maintenance of glucose homeostasis in some circumstances. However, an inability to respond to different stresses may tip the balance towards glucose intolerance later in life.

## Introdução

A desnutrição permanece predominante em muitos países em desenvolvimento; onde a incidência do diabetes mellitus tornou-se crescente nas últimas décadas. Historicamente, formas avançadas de diabetes mellitus (diabetes tipo J, tipo K) foram descritas em países tropicais. Contudo, essas formas são consideradas somente em uma minoria de casos de diabetes mellitus em países onde a desnutrição é comum. Diabetes não-insulino dependente, sem levar em consideração a obesidade, contribui com 20% dos casos de diabetes nesses países. Apesar da desnutrição provavelmente influenciar o diabetes mellitus, não está claro se existe uma ligação casual entre as duas condições permanentes (SIDIBE et al., 1999). Estudos epidemiológicos mostraram que cerca de 45% de crianças que pesavam menos que 2,5 kg ao nascimento e 8 kg com um ano de idade, foram acometidas por diabetes e doenças cardiovasculares aos 64 anos (HALES et al., 1991; DESAI et al., 1995; PASSOS et al., 2000). Dados recentes indicam, também, que crianças nascidas em áreas pobres, onde o baixo peso ao nascer é prevalente, apresentam níveis elevados de colesterol e glicose séricos associados a baixos teores circulantes de insulina e hipertensão (KING et al., 1990; MIE et al., 2000). Estas anormalidades não são aquisições da vida adulta porque elas podem estar presentes precocemente, aos 3 anos de idade (DESAI et al., 1995).

Estas alterações metabólicas e cardiovasculares que levam a doenças crônicas como diabetes e hipertensão são iniciadas *in utero*. Eventos biológicos na mãe, como desnutrição, transmitiriam sinais para o meio intra-uterino, que afetaria a programação do crescimento e da diferenciação celulares e alteraria o funcionamento de sistemas enzimáticos (DAHARI et al., 1995; OZANNE; HALES, 1999).

Os efeitos da desnutrição materna sobre o metabolismo glicídico da prole ao longo da vida têm sido focalizados experimentalmente em ratas grávidas alimentadas durante a gestação com dietas hipoprotéicas/normocalóricas e suas crias (LATORRACA et al., 1998b; PENNINGTON et al., 2001). Filhotes nascidos de mães alimentadas com dietas hipoprotéicas apresentam baixo peso corpo-

ral (MELLO et al., 1987; PENNINGTON et al., 2001) e são hipoglicêmicos e hipoinsulinêmicos (MELLO et al., 1987). Quando ilhotas pancreáticas isoladas de fetos deficientes em proteína são estimuladas *in vitro* com secretagogos como glicose, leucina e arginina, a resposta insulínica é baixa (DAHARI et al., 1991; SOLIMAN et al., 2000). Após o desmame, a prole de ratas que sofreram restrição protéica dietética durante a gestação e lactação mostram redução na secreção de insulina induzida por glicose *in vivo* (LATORRACA et al., 1999). Quando suas ilhotas são estimuladas *in vitro* com glicose, leucina ou arginina, a secreção de insulina mostra-se significativamente menor em comparação com ilhotas controles (LATORRACA et al., 1999). Tais anomalias não são totalmente revertidas pela alimentação com dieta normoprotéica do nascimento ou desmame em diante (DAHARI et al., 1995; LATORRACA et al., 1998a).

O crescimento e a função dos sítios de ação da insulina (fígado, tecido adiposo e músculo) também são alterados pela desnutrição intra-uterina e pós-natal. A restrição protéica modifica permanentemente a atividade das enzimas hepáticas glicoquinase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase, envolvidas no metabolismo da glicose. Essa modificação, que consiste na redução da atividade da glicoquinase e no aumento da atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, indica aumento da síntese e comprometimento da utilização da glicose (LATORRACA et al., 1998b; SOLIMAN et al., 2000). A regulação hormonal da produção de glicose também acha-se alterada nesse modelo animal. Em ratos adultos recuperados de desnutrição intra-uterina e neonatal, a insulina é incapaz de inibir a produção de glicose hepática estimulada pelo glucagon e ao mesmo tempo, esses animais são resistentes à ação do primeiro hormônio. Os níveis de receptores de glucagon estão reduzidos enquanto que a concentração de receptores de insulina e de transportador de glicose 2 (GLUT 2) encontram-se aumentados na membrana dos hepatócitos de ratos recuperados de desnutrição (BADALOO et al., 1999; MANZANO, 2001).

A desnutrição intra-uterina, ainda, reduz o tamanho das fibras musculares e dos adipócitos. A quantidade de receptores de insulina presentes na membrana dos tecidos muscular e adiposo está aumentada e os níveis de transportador de gli-

cose 4 (GLUT 4) nas membranas desses tecidos não estão modificados em animais recuperados de desnutrição intra-uterina e pós natal (REIS et al., 1997; ZANQUETA, 2001). O músculo estriado esquelético apresenta hipersensibilidade à insulina associada a aumento nas etapas iniciais da sinalização intracelular do hormônio (LATORRACA et al., 1999).

É necessário destacar que, embora atrativo, o conceito de “programação metabólica desordenada” durante o desenvolvimento, que conduziu à hipótese de que eventos muito precoces levariam a perturbações da homeostase glicêmica na vida adulta, também tem sofrido críticas. HOLNESS e SUDGEN (1996) não constataram comprometimento importante na secreção de insulina estimulada pela glicose nem na ação da insulina em ratas adultas recuperadas de desnutrição protéica sofrida na vida intra-uterina e na lactação quando submetidas à sobrecarga metabólica da gravidez.

## Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos imediatos e tardios da restrição protéica durante a vida intra-uterina e a lactação sobre a ação periférica da insulina em ratos recém desmamados e adultos, submetidos à situação de resistência à insulina (jejum) e de hipersensibilidade ao hormônio (exercício).

## Materiais e Métodos

Foram utilizadas ratas adultas (90 dias de idade) da linhagem Wistar, as quais foram acasaladas com machos da mesma idade e linhagem por uma noite. A gravidez foi confirmada através de exame do esfregaço vaginal para a presença de espermatozoides. As ratas grávidas foram separadas ao acaso e alimentadas, durante a gravidez e a lactação, com dietas isocalóricas contendo 6% (H= dieta hipoprotéica) ou 17% (N= dieta normoprotéica) de proteína, servidas à vontade. As crias foram desmamadas aos 21 dias e os machos foram separados e mantidos com dieta com 17% de proteína até a idade adulta (90 dias).

A composição da dieta normoprotéica foi a seguinte (g/kg): caseína (84% proteína) 202; amido de milho 397; dextrina 30,5; sacarose 100; óleo de soja 70; mistura de sais (AIN-93) 35; mistura vitamínica (AIN-93) 10; cistina 3 e 1 cloridrato de colina 2,5. A dieta hipoprotéica diferiu nas quantidades de (g/kg): caseína (84% proteína) 71,5; amido de milho 480; dextrina 159; sacarose 121 e cistina 1. As composições das misturas de sais e vitaminas acham-se descritas em REEVES et al. (1993).

Os animais foram pesados uma vez por semana. Parte foi avaliada ao desmame e outra parte, na idade adulta. Em ambas as ocasiões, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina. Quarenta e oito horas após o teste, os ratos foram sacrificados por decapitação e as seguintes determinações foram efetuadas: teores séricos de glicose, ácidos graxos livres (AGL) (NOGUEIRA et al., 1990) e insulina (HEBERT et al., 1967); teores hepáticos de glicogênio (HASSID; ABRAHAM, 1957) e gordura (NOGUEIRA et al., 1990). No momento do sacrifício, também, foram retiradas tiras longitudinais do músculo sóleo para a avaliação da ação da insulina sobre captação e oxidação de glicose *in vitro*. Na idade adulta, o teste de tolerância à insulina e as avaliações do metabolismo glicídico muscular foram efetuadas com os animais em 3 condições diferentes: controle (estado alimentado, em repouso), exercício (estado alimentado, imediatamente após uma sessão de 30 minutos de natação suportando sobrecarga de 5% do peso corporal) e jejum (48 horas de jejum, em repouso). As demais avaliações na idade adulta e todas realizadas ao desmame foram feitas nos animais na condição controle.

### Teste de Tolerância à insulina (TTI)

Para a realização do teste, os animais foram sangrados, por meio de corte na extremidade da cauda, para determinação dos níveis basais de glicose. Para obtenção dos outros pontos da curva do TTI, injetou-se insulina na dose de 30 mU/100g de peso corpóreo, via subcutânea, em cada animal. Após 30, 60 e 90 minutos foi coletado sangue da mesma forma descrita para os valores basais. Foi calculada a constante para o desaparecimento da glicose sérica (kitt) a partir da fórmula  $0,693/t_{1/2}$ . A glicose sérica  $t_{1/2}$  foi calculada pela inclinação

da reta obtida através da análise dos mínimos quadrados das concentrações séricas de glicose 0-60 min após a administração da insulina (quando a concentração sérica de glicose normalmente cai linearmente).

### **Metabolismo da glicose no músculo sóleo isolado**

Fatias (25-35 mg) do músculo sóleo foram incubadas na presença de insulina [100  $\mu$ U/ml] e glicose [5, 5 mM, contendo U14C glicose e [3H] 2-deoxiglicose (2DG) para determinação de: captação e oxidação de glicose. A captação de glicose foi avaliada utilizando-se a [H3] 2DG como marcador, a quantificação desse processo foi efetuada medindo-se a radioatividade do 3H contida na fase alcalina, por meio de contador de partículas beta. Para a estimativa da glicose oxidada (produção de CO<sub>2</sub>), foi determinada a radioatividade do 14C existente na hiamina, líquido presente em frascos especiais colocados no sistema de incubação (MELLO et al., 2001).

### **Procedimentos estatísticos**

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Para comparação entre os grupos (hipoprotéico e normoprotéico) foi utilizado o teste "t" de student não pareado, prefixando-se, em todos os casos, o nível de significância em 5%.

## **Resultados e Discussão**

Os animais alimentados com dieta hipoprotéica, contendo 6% de proteína, apresentaram peso corporal ao nascimento ( $4,83 \pm 0,80$  g), peso corporal ao desmame ( $34,41 \pm 5,82$  g) e ganho de peso corporal ( $30,87 \pm 6,39$  g) significativamente menores quando comparados aos animais alimentados com dieta normoprotéica, 17% de proteína (peso ao nascimento -  $5,37 \pm 0,48$  g; peso ao desmame -  $130,99 \pm 13,41$  g; ganho de peso -  $125,35 \pm 14,49$  g). Esses resultados indicam que a alimentação das ratas, do período de gestação até o desmame, com a dieta hipoprotéica foi eficaz em causar um quadro de desnutrição nos filhotes. TORUN; CHEW (1994), relatam que a diminuição

do peso corporal é uma medida clínica utilizada para caracterizar a desnutrição proteico-energética, sendo este parâmetro significativamente menor nos animais alimentados com dieta de baixo valor nutritivo em relação aos animais alimentados com dieta contendo valores e quantidades adequadas de nutrientes, principalmente proteína. Todas as diferenças observadas entre os animais mantidos com dieta hipoprotéica e aqueles mantidos com dieta normoprotéica, provavelmente foram desencadeadas pela desigualdade no teor protéico da dieta, uma vez que as dietas tinham o mesmo conteúdo energético e estudos prévios utilizando as mesmas dietas aqui empregadas não mostraram redução da ingestão alimentar em animais hipoprotéicos (LATORRACA et al., 1998b).

A redução de peso corporal ao desmame está, provavelmente, associada com os baixos níveis séricos de glicose ( $90,35 \pm 12,06$  mg/dL) nos filhotes das mães desnutridas quando comparados com os filhotes das mães eutróficas ( $106,58 \pm 7,44$  mg/dL), uma vez que estudos anteriores apontaram inter-relação entre hipoglicemia e retardo no crescimento fetal (MELLO et al., 1987). Os resultados referentes à glicose sérica dos filhotes confirmam dados descritos anteriormente na literatura onde os valores de glicose encontrados em organismos desnutridos são geralmente menores do que os observados em eutróficos (TORUN; CHEW, 1994; GOBATTO, 1997; LATORRACA et al., 1998).

A redução ponderal também pode estar relacionada ao suprimento reduzido de insulina da mãe, já que o conteúdo de insulina do pâncreas endócrino materno tem-se mostrado significativamente reduzido em ratas alimentadas com dieta hipoprotéica no período de gestação (DAHRI et al., 1995). A insulina exerce importante efeito no crescimento de órgãos e no metabolismo fetal, como avaliado pela hiperinsulinemia e macrossomia de filhotes de mães diabéticas (VAN ASSCHE; AERTS, 1979). No presente estudo, os valores de insulina sérica foram inferiores nos filhotes hipoprotéicos ( $8,73 \pm 1,77$   $\mu$ U/ml) quando comparados aos normoprotéicos ( $21,44 \pm 7,46$   $\mu$ U/ml), confirmando resultados de outros estudos encontrados na literatura (BERTIN et al., 1999; SOLIMAN et al., 2000). A reduzida secreção de insulina pode resultar do decréscimo na síntese de insulina em

animais desnutridos. A restrição protéica durante a gestação produz uma variedade de mudanças no pâncreas das crias, incluindo a redução no tamanho das ilhotas e uma diminuída proliferação de células  $\beta$  (LATORRACA et al., 1998).

No presente estudo, os animais alimentados com dieta hipoprotéica apresentaram diminuição nos níveis de proteínas totais ( $4,04 \pm 0,24$  g/dL) e albumina ( $2,69 \pm 0,53$  g/dL) séricos quando comparados com os animais que receberam dieta normoprotéica (proteínas totais -  $5,11 \pm 0,26$  g/dL; albumina -  $4,05 \pm 0,33$  g/dL), confirmando alguns resultados já descritos na literatura (OKITOLONDA et al., 1987; LATORRACA et al., 1998). Porém, há relatos de concentrações semelhantes de proteínas totais e albumina séricos entre animais deficientes em proteína e controles (MELLO, 1985; LOPEZ-PEDROSA et al., 1998). Essas controvérsias podem estar relacionadas com o tempo de duração da desnutrição e da idade dos animais.

Os teores de AGL dos animais hipoprotéicos ( $227,49 \pm 90,63$   $\mu$ Eq/L) do presente estudo tenderam a ser menores do que os normoprotéicos ( $269,46 \pm 134,32$   $\mu$ Eq/L). Isto confirma dados anteriores da literatura (NOGUEIRA, 2000; SOLIMAN et al., 2000). Muitos fatores podem contribuir para essa redução, como o conteúdo inadequado de ácidos graxos essenciais na dieta, deficiência na absorção e inadequada utilização de lipídios, deficiência na síntese ou aumento da degradação oxidativa de ácidos graxos (FRANCO et al., 1999; HOUSSAINI et al., 1999). Estudos experimentais com animais têm mostrado que a 6-desaturase, uma enzima chave na síntese de ácidos graxos essenciais, encontra-se inibida no jejum e na deficiência de insulina, proteína e zinco, condições freqüentemente observadas em crianças desnutridas (TOMAS et al., 1980; GOLDEN; GOLDEN, 1981).

Com relação aos lipídios hepáticos, houve um aumento significativo nos animais hipoprotéicos ( $31,70 \pm 15,27$  mg/100mg) em relação aos normoprotéicos ( $19,17 \pm 4,28$  mg/100mg), o que confirma os resultados encontrados na literatura (HEARD et al., 1977; MELLO, 1985). Concentrações elevadas de lipídios no fígado na desnutrição protéica, podem ser provenientes da constante oferta de carboidratos pela dieta, sendo que a dieta

utilizada no presente estudo possui característica hiperglicídica, em conseqüência da troca de parte das proteínas por carboidratos, a fim de que as dietas normo e hipoprotéica sejam isocalóricas. Outra hipótese seria o transporte deficiente de lipídios para fora do fígado. Ocorreriam defeitos na liberação de triglicérides hepáticos, conseqüentes à redução de proteínas transportadoras, cuja síntese seria sensível à restrição protéica da dieta. O transporte de lipídios a partir do fígado seria prejudicado, o que explicaria o acúmulo de lipídios hepáticos com a ingestão de dieta deficiente em proteínas (KUMAR et al., 1972).

Em todos os tempos do Teste de Tolerância à Insulina (TTI) os maiores valores séricos de glicose foram constatados nos animais normoprotéicos (dados não apresentados). Por outro lado, os animais hipoprotéicos apresentaram maiores valores de kitt ( $4,07 \pm 0,95$ ) que os normoprotéicos ( $2,93 \pm 0,87$ ).

A captação e oxidação de glicose pelo músculo sóleo foram semelhantes nos animais hipoprotéicos (captação -  $2,06 \pm 0,52$   $\mu$ mol/gh; oxidação -  $17,62 \pm 5,46$   $\mu$ mol/gh) e normoprotéicos (captação -  $2,57 \pm 0,95$   $\mu$ mol/gh; oxidação -  $12,79 \pm 5,68$   $\mu$ mol/gh) do presente estudo, o que confirma os resultados encontrados anteriormente na literatura (GOBATO, 1997). Porém, há estudos que mostraram maior captação de glicose pelo músculo sóleo isolado de animais desnutridos em relação aos controles (CRACE et al., 1990; OZANNE; HALES, 1999), com aumento nas etapas iniciais de sinalização da insulina nesse tecido (LATORRACA et al., 1998a).

Na idade adulta, o peso corporal dos animais hipoprotéicos permaneceu significativamente menor que o dos normoprotéicos (**Tabela 1**). Em relação ao ganho de peso do desmame à idade adulta, foram encontradas diferenças significantes entre os dois grupos, sendo que os animais hipoprotéicos tiveram um aumento inferior ao dos animais normoprotéicos (9,70%). Esses resultados confirmam os encontrados por LATORRACA et al. (1998a), onde o ganho de peso corporal dos animais alimentados com uma dieta hipoprotéica durante a gestação e lactação e recuperados após o desmame foi significativamente menor em comparação com os animais normoprotéicos.

**Tabela 1**

Peso corporal na idade adulta (g) e ganho de peso corporal do desmame à idade adulta (g).

	<b>Normoprotéico</b>	<b>Hipo/normoprotéico</b>
Peso corporal na idade adulta	430,08 ± 40,04	304,66 ± 30,85*
Ganho de peso corporal	299,29 ± 36,88	270,25 ± 29,90*

Resultados expressos como média e desvio padrão de 10 animais por grupo.

\*Diferença significativa ( $p < 0,05$ , teste "t" não pareado) em relação ao grupo normoprotéico

Na **Tabela 2**, encontram-se os resultados relativos a teores séricos de glicose, proteína total, albumina, ácidos graxos livres (AGL) e insulina dos animais na idade adulta, em três condições diferentes: controle (estado alimentado, em repouso), exercício (estado alimentado, imediatamente após uma sessão de 30 minutos de natação suportando sobrecarga de 5% do peso corporal) e jejum (48 horas de jejum, em repouso).

Na situação controle, os teores séricos de glicose, proteína total, albumina, AGL e insulina foram restabelecidos, pois não houve diferença significativa entre os animais normoprotéicos e os hipo/normoprotéicos (**tabela 2**). Isto confirma estudos anteriores (GOBATO, 1997; LATORRACA et al., 1998a; MOREIRA, 2000), onde os teores séricos de proteína total, albumina, ácidos graxos livres (AGL) e insulina foram semelhantes entre animais desnutridos e posteriormente recuperados e animais eutróficos, e sugere a eficácia do protocolo de dieta em promover a restauração dessas variáveis bioquímicas, ao menos na ausência de estresse.

Para averiguar se a homeostase do meio interno seria preservada nos animais previamente desnutridos na vigência de estresse, os mesmos foram submetidos ao jejum e ao exercício agudo. Comparando os animais em jejum com a situação controle, os teores séricos de glicose foram significativamente menores nos grupos normoprotéicos e hipo/normoprotéicos (**Tabela 2**). Os teores séricos de glicose foram significativamente maiores nos grupos normoprotéicos e hipo/normoprotéicos imediatamente após o exercício em relação ao estado controle (**Tabela 2**). Isso mostra que os dois grupos responderam da mesma maneira em situações diferentes: jejum e exercício, dando indícios de recuperação nutricional. GOBATO (1997) encontrou resultados semelhantes nos valores de

glicose sérica entre animais controles sedentários e treinados, e recuperados sedentários e treinados, mostrando assim que o estado nutricional e o treinamento físico não alteraram os níveis séricos de glicose.

Em ambos os grupos, os ácidos graxos livres foram significativamente maiores no estado jejum e após o exercício agudo em relação ao controle (**tabela 2**). Esses resultados confirmam os encontrados por STEVANATO (1999), onde houve efeito significativo do jejum e do exercício agudo no aumento da concentração de AGL em relação ao estado alimentado e ao repouso respectivamente.

A insulina sérica foi significativamente menor nos animais de ambos os grupos, em jejum e após uma sessão de exercício em comparação com a situação controle, conforme esperado (**tabela 2**). Em conjunto, esses resultados referentes à glicose e insulina séricas, sugerem que o protocolo de dieta empregado foi eficiente em restaurar a capacidade bioquímica dos animais inicialmente desnutridos em responder adequadamente ao estresse do jejum e do exercício agudo em relação a esses parâmetros.

Em relação às proteínas totais e albumina séricas no jejum, foram encontrados valores semelhantes ao estado controle nos animais normoprotéicos, mas significativamente menores nos animais hipo/normoprotéicos (**Tabela 2**). Isso indica que o comprometimento do metabolismo protéico desencadeado pela desnutrição protéica precoce permanece mesmo após a realimentação por período prolongado com dieta contendo teor adequado de proteína. Quando submetidos ao estresse do jejum, as alterações remanescentes são destacadas. Por outro lado, a proteína total e albumina séricas foram semelhantes em ambos os grupos (normoprotéicos e hipo/normoprotéicos) após o exercício

**Tabela 2**

Teores séricos de glicose (mg/dL), proteína total (g/dL), albumina (g/dL), ácidos graxos livres (AGL em  $\mu\text{Eq/L}$ ) e insulina ( $\mu\text{U/ml}$ ) dos animais na idade adulta, em três diferentes condições.

	Normoprotéico			Hipo/normoprotéico		
	Controle <sup>o</sup>	Jejum	Exercício	Controle <sup>o</sup>	Jejum	Exercício
Glicose sérica	101,82 ± 19,92	66,49* ± 16,07	160,26* ± 18,77	109,09 ± 24,49	72,47* ± 18,22	154,03* ± 38,88
Proteína sérica	5,95 ± 1,39	5,15 ± 1,34	6,81 ± 0,49	6,32 ± 0,36	5,31* ± 0,74	6,33 ± 0,62
Albumina sérica	3,23 ± 0,76	2,52 ± 1,03	3,01 ± 0,54	3,40 ± 1,14	2,24* ± 0,31	2,87 ± 0,31
AGL	214,29 ± 63,89	442,86* ± 81,65	330,00* ± 92,20	194,29 ± 44,26	452,86* ± 106,70	355,71* ± 86,90
Insulina sérica	18,69 ± 4,83	11,68* ± 2,82	11,88* ± 3,18	18,37 ± 3,68	12,82* ± 4,46	13,92* ± 3,60

Resultados expressos como média e desvio padrão de 10 animais por grupo.

<sup>o</sup>Controle é a situação onde o animal se encontra no estado alimentado em repouso.

\*Diferença significativa ( $p < 0,05$ , análise de variância two-way) em relação ao respectivo grupo controle.

e na situação controle, confirmando resultados anteriores (GOBATTO, 1997; MOREIRA, 2000), onde animais treinados e sedentários, independente do estado nutricional (controle ou recuperado), apresentaram teores séricos de proteína e albumina semelhantes. Em resumo, a análise dos resultados referente à proteínas totais e albumina séricas sugerem que a manutenção da homeostase nos indivíduos recuperados de desnutrição é frágil. Em vigência de estresse, o equilíbrio é quebrado, podendo aparecer anomalias.

Na idade adulta, na situação controle, os teores hepáticos de glicogênio foram significativamente maiores nos animais hipo/normoprotéicos quando comparados aos normoprotéicos (**Tabela 3**), enquanto ao desmame os teores hepáticos de glicogênio achavam-se semelhantes entre os dois grupos. Isso pode decorrer de uma manifestação tardia da desnutrição dos animais em relação a esse parâmetro, pois GOBATTO (1997) encontrou em animais desnutridos após o desmame valores hepáticos de glicogênio elevados em comparação ao grupo controle. Talvez em animais submetidos à desnutrição por período mais prolongado a alteração só seja posta em evidência quando a realimentação se processa.

Quando submetidos ao jejum, os animais de ambos os grupos (normoprotéicos e hipo/normo-

protéicos) apresentaram teores hepáticos de glicogênio significativamente menores em relação à situação controle (**Tabela 3**). Em relação aos teores hepáticos de glicogênio após o exercício agudo e na situação controle, não houve diferença significativa nos animais normoprotéicos. Por outro lado, nos animais hipo/normoprotéicos foram encontrados valores significativamente menores após o exercício em relação ao estado controle (**Tabela 3**). Isto sugere que os animais normoprotéicos não precisaram dos estoques de glicogênio hepático durante o exercício de natação, ao passo que os hipo/normoprotéicos utilizaram esse substrato como fonte energética durante esse exercício. Mais uma vez aqui parece haver ruptura da homeostase quando os animais recuperados da desnutrição são submetidos ao estresse.

Na situação controle, os lipídios hepáticos foram restabelecidos com a recuperação nutricional, pois não houve diferença significativa entre os animais normoprotéicos e os hipo/normoprotéicos (**tabela 3**), enquanto que ao desmame esses valores estavam significativamente maiores nos animais hipoprotéicos. Em jejum, os teores de lipídios hepáticos foram semelhantes em ambos os grupos em relação à situação controle. Porém, esses valores encontraram-se significativamente reduzidos nos animais normoprotéicos imediatamente após

**Tabela 3**

Teores hepáticos de glicogênio (mg/100mg) e lipídios (mg/100mg) dos animais na idade adulta, em três diferentes condições.

	Normoprotéico			Hipo/normoprotéico		
	Controle <sup>o</sup>	Jejum	Exercício	Controle <sup>o</sup>	Jejum	Exercício
Glicogênio Hepático	5,83 ± 1,34	0,75* ± 0,09	5,10 ± 1,30	7,16 ± 1,02	0,72* ± 0,09	4,75* ± 1,29
Lipídios Hepáticos	7,19 ± 0,89	7,15 ± 0,62	6,60* ± 0,93	6,80 ± 0,53	7,76 ± 2,05	6,57 ± 0,78

Resultados expressos como média e desvio padrão de 10 animais por grupo.

<sup>o</sup>Controle é a situação onde o animal se encontra no estado alimentado em repouso.

\*Diferença significativa ( $p < 0,05$ , análise de variância two-way) em relação ao respectivo grupo controle.

o exercício, ao passo que nos animais hipo/normoprotéicos os resultados foram semelhantes em relação ao estado controle (**tabela 3**). Isto pode ser reflexo remanescente de defeitos na liberação de triglicérides hepáticos conseqüentes à redução de proteínas transportadoras ocasionada pela desnutrição (KUMAR et al., 1972).

Os teores de glicose no soro dos animais e taxa de remoção da glicose (Kitt) durante o TTI realizado na idade adulta, nas três condições: controle, exercício e jejum, acham-se na **tabela 3**.

Na situação controle, foram encontradas diferenças significantes entre os animais normoprotéicos e hipo/normoprotéicos nos valores de glicose sérica somente aos 90 minutos do TTI, sendo os maiores valores observados nos animais hipo/normoprotéicos (**tabela 4**). MOREIRA (2000) encontrou maiores valores de glicose sérica em animais recuperados nos tempos 30, 60 e 180 minutos do TTI, em relação aos animais controles. Em conjunto, os resultados do presente estudo e aqueles relatados por MOREIRA (2000) parecem corroborar com a hipótese de que eventos precoces na vida do animal podem determinar alterações duradouras na homeostase glicêmica e na resposta à insulina.

Na situação jejum, em relação à controle, os teores séricos de glicose foram significativamente menores em ambos os grupos nos tempos 0, 30 e 60, sendo que aos 90 minutos do TTI, somente no grupo hipo/normoprotéico essa diferença foi encontrada (**tabela 4**).

Os teores séricos de glicose foram signifi-

cantemente maiores nos grupos normoprotéicos e hipo/normoprotéicos imediatamente após o exercício em relação ao estado controle antes de iniciar o teste (tempo 0) e aos 30 minutos do TTI. Nos tempos 60 e 90, não foram encontradas diferenças significantes em ambos os grupos quando comparados às respectivas situações controles (**tabela 4**).

Quanto ao Kitt não houve diferença significativa entre os dois grupos na situação controle (**tabela 4**), confirmando resultados encontrados na literatura (MOREIRA, 2000). Porém, esses resultados diferem dos encontrados por LATORRACA et al. (1998a), onde os animais recuperados apresentaram maior Kitt após injeção intravenosa de insulina em relação ao estado controle. A Kitt foi significativamente menor nos grupos normoprotéicos e hipo/normoprotéicos tanto no jejum, quanto após o exercício, em relação à situação controle.

Na **tabela 5** encontram-se a captação e oxidação de glicose pelo músculo sóleo dos animais na idade adulta, nas três condições: controle, exercício e jejum. Na situação controle, não foram constatadas diferenças significantes entre os dois grupos na captação de glicose. Contrariamente, GOBATO (1997) encontrou maior captação de glicose pelo músculo sóleo nos animais controles em relação aos recuperados na condição de repouso. Em jejum, a captação de glicose foi semelhante nos animais normoprotéicos e significativamente menor nos animais hipo/normoprotéicos (**tabela 5**).

Em relação ao exercício agudo, os animais normoprotéicos apresentaram maiores valores de

captação de glicose comparados à situação controle, enquanto os animais hipo/normoprotéicos apresentaram valores semelhantes (**tabela 5**).

Em relação à oxidação de glicose, não foram constatadas diferenças significantes entre os dois grupos na situação controle (**tabela 5**). Em jejum, a oxidação de glicose foi semelhante nos animais normoprotéicos e significantemente menor nos animais hipo/normoprotéicos quando comparados à situação controle (**tabela 5**). Esses resultados reforçam a hipótese de que eventos nutricionais precoces estariam “programando” alterações duradouras no metabolismo glicídico que são postas

em evidência em condições de estresse. Por outro lado, não foram encontradas diferenças significantes entre o exercício agudo e a situação controle nos animais de ambos os grupos.

Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que a restrição protéica fetal/neonatal levam a adaptações que capacitam o organismo a manter a homeostase glicêmica na ausência de estresse. Contudo, a incapacidade em responder adequadamente a diferentes estresses pode romper o equilíbrio e levar à intolerância à glicose posteriormente na vida.

**Tabela 4**

Teores de glicose (mg/dL) no soro dos animais e taxa de remoção da glicose (Kitt em % min) durante teste de tolerância à glicose na idade adulta, em três condições diferentes.

Tempo (min) após administração de insulina	Normoprotéico			Hipo/normoprotéico		
	Controle <sup>o</sup>	Jejum	Exercício	Controle <sup>o</sup>	Jejum	Exercício
<b>0</b>	85,00 ± 8,92	57,87* ± 3,63	107,22* ± 11,13	91,13 ± 4,26	54,84* ± 5,24	112,61* ± 18,04
<b>30</b>	58,33 ± 6,33	48,78* ± 9,31	81,11* ± 12,06	59,33 ± 4,66	45,75* ± 11,38	91,30* ± 17,87
<b>60</b>	64,00 ± 8,14	41,21* ± 4,09	67,22 ± 13,97	59,67 ± 7,77	38,48* ± 2,87	65,22 ± 12,64
<b>90</b>	50,66 ± 22,28	42,04 ± 4,42	68,88 ± 20,49	67,00 ± 7,93	34,85* ± 2,58	57,39 ± 13,57
<b>kitt</b>	1,258 ± 0,268	0,765* ± 0,247	0,946* ± 0,314	1,494 ± 0,347	0,849* ± 0,473	0,712* ± 0,437

Resultados expressos como média e desvio padrão de 10 animais por grupo.

<sup>o</sup>Controle é a situação onde o animal se encontra no estado alimentado em repouso.

\*Diferença significativa ( $p < 0,05$ , análise de variância two-way) em relação ao respectivo grupo controle.

**Tabela 5**

Captação e oxidação de glicose ( $\mu\text{mol/gh}$ ) pelo músculo sóleo dos animais na idade adulta, em três condições diferentes.

	Normoprotéico			Hipo/normoprotéico		
	Controle <sup>o</sup>	Jejum	Exercício	Controle <sup>o</sup>	Jejum	Exercício
Captação de glicose	3,95 ± 0,57	3,61 ± 0,72	4,61* ± 0,29	4,63 ± 1,02	3,88* ± 0,42	4,60 ± 0,59
Oxidação de glicose	17,88 ± 5,05	20,93 ± 11,29	22,21 ± 7,70	22,31 ± 4,70	17,38* ± 5,00	19,62 ± 6,11

Resultados expressos como média e desvio padrão de 10 animais por grupo.

<sup>o</sup>Controle é a situação onde o animal se encontra no estado alimentado em repouso.

\*Diferença significativa ( $p < 0,05$ , análise de variância two-way) em relação ao respectivo grupo controle

## Conclusões

A partir dos resultados apresentados ao desmame podemos concluir que os animais hipoprotéicos não apresentaram hiperglicemia a despeito das baixas concentrações de insulina sérica. Isso pode ser atribuído, pelo menos em parte, ao aumento na taxa de remoção da glicose sérica em resposta à insulina. O aumento da resposta à insulina deve acontecer em tecidos diferentes do muscular, pois não foi verificado aumento da captação de glicose pelo músculo esquelético.

De acordo com os resultados apresentados na idade adulta, podemos concluir que a análise dos resultados referentes à proteínas totais e albumina séricas, glicogênio e lipídios hepáticos, sugerem que a manutenção da homeostase nos animais re-

cuperados de desnutrição é frágil, pois em vigência do estresse do jejum e do exercício o equilíbrio é quebrado. Os animais hipo/normoprotéicos apresentaram valores glicêmicos superiores aos dos normoprotéicos aos 90 minutos do TTI, sugerindo menor captação de glicose periférica em resposta à insulina. Isso pode ser devido ao aumento da resistência periférica à insulina, levando esses animais a uma situação que pode predispor ao diabetes mellitus. Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que a restrição protéica fetal/neonatal levam a adaptações que capacitam o organismo a manter a homeostase glicêmica na ausência de estresse. Contudo, a incapacidade em responder adequadamente a diferentes estresses pode romper o equilíbrio e levar à intolerância à glicose posteriormente na vida.

## Referências Bibliográficas

- BERTIN, E. et al. Glucose metabolism and  $\beta$ -cell mass in adult offspring of rats protein and/or energy restricted during the last week of pregnancy. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 277, p. E11-E17, 1999.
- CRACE, C.J. et al. Protein energy malnutrition induces changes in insulin sensitivity. **Diabetes Metabolism**, New York, v. 16, p. 484-91, 1990.
- DAHARI, S. et al. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. **Diabetes**, New York, v. 40, n. 2, p. 115-20, 1991.
- DAHRI, S. et al. Nutricional influences on pancreatic development and potential links with non-insulin dependent diabetes. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 54, p. 345-56, 1995.
- DESAI, M. et al. Adult glucose and lipid-metabolism may be programmed fetal life. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 23, p. 331-5, 1995.
- FRANCO, V.H.M. et al. Plasma fatty acids in children with grade III protein-energy malnutrition in its different clinical forms: Marasmus, Marasmic Kwashiorkor and kwashiorkor. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v. 45, p. 71-5, 1999.
- GOBATO, C.A. **Metabolismo glicídico em músculo sóleo isolado de ratos desnutridos e recuperados. Efeito dos ácidos graxos livres e do treinamento físico**. 1997. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- GOLDEN, M.H.N.; GOLDEN, B.E. Effect of zinc supplementation on the dietary intake, rate of weight gain, and energy cost of tissue deposition in children recovering from severe malnutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 34, p. 900-8, 1981.
- HALES, C.N. et al. Fetal and infant growth and impaired glucose-tolerance at age 64. **British Medical Journal**, Edinburgh, v. 303, n. 6809, p. 1019-22, 1991.
- HASSID, W.Z.; ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. **Methods in Enzymology**, New York, v. 3, p. 34-50, 1957.
- HEARD, C.R.C. et al. Biochemical characteristics of different forms of protein-energy malnutrition. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 37, p. 1-21, 1977.

- HERBERT, V. et al. Coated charcoal immunoassay of insulin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Baltimore, v. 25, p. 1375-84, 1967.
- KING, H. et al. Plasma-glucose and insulin responses in young papua new guineans (aged 10-19 years). **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 153-9, 1990.
- KUMAR, V. et al. Mechanism of fatty liver in protein deficiency. An experimental study in the rhesus monkey. **Gastroenterology**, New York, v. 62, p. 445-51, 1972.
- LATORRACA, M.Q. et al. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, n. 10, p. 1643-9, 1998a.
- LATORRACA, M.Q. et al. Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 80, n. 3, p. 291-7, 1998b.
- LATORRACA, M.Q. et al. Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with a diminished calcium uptake. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 10, p. 37-43, 1999.
- LOPEZ-PEDROSA, J.M. et al. Severe malnutrition alters lipid composition and fatty acid profile of small intestine in Newborn Piglets. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, n. 2, p. 224-33, 1998.
- MANZANO, A.M.C. Hipoalbuminemia en diálisis. Es marcador de desnutrición o de inflamación? **La revista de investigación clínica**, Mexico, v. 53, n. 2, p. 152-8, 2001.
- MELLO, M.A.R. **Desnutrição proteico-calórica, gravidez e desenvolvimento materno. Estudo comparativo de alterações corporais e metabólicas entre ratas jovens e adultas**. 1985. 125f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MELLO, M.A.R. et al. Protein-calorie malnutrition in the young pregnant rat factors involved in fetal growth impairment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 20, Iss. 5, p. 575-7, 1987.
- MIE, J. et al. Effects of infant birthweight and maternal body mass index in pregnancy on components of the insulin resistance syndrome in China. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 132, n. 4, p. 253-60, 2000.
- MOREIRA, V.M. **Função endócrina do pâncreas de ratos frente ao treinamento físico durante recuperação de desnutrição protéica**. 2000. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- NOGUEIRA, D.M. et al. Sangue – parte I. In: NOGUEIRA, D.M. et al. **Métodos de Bioquímica Clínica**. São Paulo: Pancast, 1990.
- NOGUEIRA, S.C.B. **Desnutrição protéica e treinamento físico: efeitos sobre a ação periférica da insulina**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- OKITOLONDA, W. et al. Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. **Diabetologia**, New York, v. 30, p. 946-51, 1987.
- OZANNE, S.E.; HALES, C.N. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 58, p. 615-9, 1999.
- PASSOS, M.C.F. et al. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 20, n. 11, p. 1603-12, 2000.
- PENNINGTON, S.N. et al. The effect of maternal malnutrition during pregnancy in the rat on the offspring's weight, glucose uptake, glucose transporter protein levels and behaviors. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 21, p. 755-69, 2001.
- REIS, M.A.B. et al. Glucose induced insulin secretion is impaired and insulin phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-I are increased in protein – deficient rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 127, p. 403-10, 1997.

- REEVES, P.G. et al. AIN-93 purified diets for Laboratory rodents: final reports of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.
- SIDIBE, E.H. et al. Role of malnutrition in diabetes mellitus. **Semaine des hopitaux**, Paris, v. 75, p.467-74, 1999.
- SOLIMAN, A.T. et al. Serum leptin concentrations during severe protein-energy malnutrition: correlation with growth parameters and endocrine function. **Metabolism Clinical and Experimental**, New York, v. 49, p. 819-25, 2000.
- STEVANATO, E. **Efeitos do jejum sobre a interação entre o metabolismo de ácidos graxos livres e glicose em músculo esquelético de ratos treinados**. 1999. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- TOMAS, M.E. et al. Effects of dietary protein and essential fatty acid deficiency on liver A5, A6 e A9 desaturase activities in the early developing rat. **Journal of Nutritional**, Philadelphia, v. 110, p. 599, 1980.
- TORUN, B.; CHEW, F. Protein energy malnutrition. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; HIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**, 8.ed., Lea 7 Febiger: Philadelphia, p. 950-76, 1994.
- VAN ASSCHE, F.A.; AERTS, L. The fetal endocrine pancreas. **Contributions to Gynecology and Obstetrics**, Berlim, v. 5, p. 44-57, 1979.
- ZANQUETTA, M.M. **Papel da desnutrição e da pinealectomia no metabolismo de carboidratos e na ação periférica da insulina**. 2001. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

## Endereço

Avenida 24-A, 1515 - Departamento Biodinâmica  
Bela Vista - CEP 13506-900  
Rio Claro – SP  
mellomar@rc.unesp.br