

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA: CIRURGIA, NUTRIÇÃO E METABOLISMO

**RESTRIÇÃO PROTÉICA NA PRENHEZ TARDIA: EFEITOS SOBRE A SÍNTESE
DE ÁCIDOS GRAXOS**

**Mestrado em Ciências da Saúde, Área de
Concentração Cirurgia, Nutrição e Metabolismo**

Orientanda: Marcia Leão Ormond Ballen

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Gaiva
Gomes da Silva**

**Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Salete Ferreira
Martins**

Cuiabá-MT

2008

I. INTRODUÇÃO

A gravidez é caracterizada por numerosas modificações metabólicas com o objetivo de reunir os requerimentos de energia necessários para o crescimento fetal. Imediatamente após a fertilização, o organismo materno dá início a uma série de reajustes para dar suporte ao crescimento normal do feto e para atender aos requerimentos da lactação^(1,2).

Do ponto de vista metabólico, a gravidez pode ser dividida em dois diferentes estágios. O primeiro que corresponde aos dois terços iniciais, quando o crescimento fetal ainda é muito limitado, a mãe armazena uma grande proporção dos nutrientes ingeridos na forma de tecido adiposo, condição observada tanto em mulheres⁽³⁾ como em ratas⁽⁴⁾, sendo reconhecida como fase anabólica. No último estágio, que corresponde ao terço final, o crescimento fetal é muito rápido, sendo estimulado por elevada transferência de substratos maternos via placentar, com predominante mobilização de lipídios (fase catabólica)^(5,6,7).

Na primeira fase da prenhez, o organismo materno desenvolve um estado de hiperinsulinemia, com sensibilidade à insulina normal ou mesmo elevada^(8,9), a qual é acompanhada de hiperfagia⁽¹⁰⁾. O aumento da ingestão alimentar⁽¹¹⁾, da lipogênese⁽¹²⁾ e da atividade da enzima lipase lipoprotéica extra-hepática^(13,14), são responsáveis pela deposição progressiva de gordura no tecido adiposo durante os primeiros dois terços da gravidez^(3,4,10).

A insulina é provavelmente o mais importante fator hormonal que influencia a lipogênese nessa fase, aumentando a captação de glicose na célula adiposa através do recrutamento de transportadores de glicose para a membrana plasmática, bem como pela ativação de enzimas glicolíticas e lipogênicas^(15,16).

Na fase final ocorre um estado de resistência à insulina^(17,18,19,20), que é caracterizada por uma intensa quebra dos estoques de lipídios, observado tanto em mulheres como em ratas^(21,22,23,24) na qual a lipólise no tecido adiposo é a condição mais representativa^(05,06,07,25), com reduzida captação de triacilgliceróis circulantes por esse tecido⁽²⁶⁾.

Apesar do aumento da liberação de ácidos graxos livres e glicerol na circulação materna, sua transferência placentar é quantitativamente baixa⁽²⁷⁾. Ao contrário, o principal destino desses produtos é o fígado materno⁽²⁸⁾ onde, após a conversão de ácidos graxos livres em acetil-CoA e de glicerol em glicerol-3-fosfato, esses são re-esterificados em triacilgliceróis, sendo incorporados em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e liberadas na circulação⁽²⁹⁾.

Em adição, o glicerol pode ser usado para a síntese de glicose e os ácidos graxos livres, pela β -oxidação podem formar acetil-CoA, favorecendo a produção de energia e a síntese de corpos cetônicos. Essas vias encontram-se marcadamente aumentadas em condições de jejum na gravidez tardia^(30,31). Como a atividade lipolítica no tecido adiposo, a secreção de VLDL hepática, a gliconeogênese e a cetogênese são inibidas pela insulina, a condição de resistência a esse hormônio irá favorecer o aumento da lipólise e a produção hepática de VLDL, a gliconeogênese e a cetogênese nas mesmas condições fisiológicas^(32,33).

Apesar desse estado de resistência já ser bem documentado, os mecanismos envolvidos não estão devidamente esclarecidos^(34,35). Alguns estudos indicam que parece ocorrer uma redução na atividade tirosina quinase dos receptores da insulina e não no número desses receptores, o que poderia ser responsável pelo estado de resistência a esse hormônio^(36,37,38,39).

Por outro lado, estudos sugerem que durante a prenhez a elevada produção de leptina poderia estar relacionada com o estado de resistência à insulina⁽⁴⁰⁾. As concentrações plasmáticas de leptina permanecem elevadas durante toda a prenhez, o que não está associado com balanço energético negativo como poderia ser esperado, talvez porque a resistência a esse hormônio nessa fase, contribui para manter a ingestão alimentar elevada e o crescimento fetal^(40,41,42,43). Alguns mecanismos de sinalização intracelular do receptor de leptina poderiam estar envolvidos nesse estado de resistência, sendo explicado pela redução da ativação de

transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STAT3) induzida pela leptina, especificamente no núcleo arqueado e no ventrículo medial do hipotálamo⁽⁴³⁾.

Estudos em ratas adultas têm demonstrado que a prolactina (PRL) age no tecido adiposo estimulando a síntese e secreção de leptina, sugerindo uma ação desse hormônio na regulação da ingestão alimentar⁽⁴⁴⁾. O efeito estimulatório da prolactina sobre o consumo alimentar pode contribuir para o aumento na ingestão tanto no período da gravidez, como na lactação⁽⁴⁵⁾. Durante a prenhez, a prolactina é produzida pelas células pituitárias da mãe e pela placenta⁽⁴⁶⁾.

A prolactina é um hormônio de origem tanto pituitária como extra-pituitária, com numerosas funções biológicas, podendo agir não apenas como um hormônio, mas também como neuro-transmissor, fator de crescimento e modulador da resposta imune tanto humoral, como celular em humanos^(47,48,49). Todas essas funções são exercidas através de mecanismos endócrinos, parácrinos e autócrinos^(50,51).

Este hormônio também pode exercer diferentes ações metabólicas no tecido adiposo em diversas espécies, tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vitro*, esse hormônio parece reduzir a ligação da insulina e a captação de glicose em adipócitos isolados de mulheres grávidas⁽⁵²⁾. Em ratas, a prolactina reduziu o transporte máximo de glicose em adipócitos isolados, sem afetar a ligação com a insulina⁽⁵³⁾. *In vivo*, a atividade da lipase lipoprotéica em roedores foi reduzida no tecido adiposo e estimulada na glândula mamária durante a lactação^(54,55,56). O pico de prolactina sérica observada na etapa final da prenhez em ratas^(57,58,59) pode contribuir para a inibição da lipogênese hepática, provavelmente devido à diminuição do suprimento de substratos para o fígado materno⁽⁶⁰⁾.

Além da regulação hormonal, a síntese de ácidos graxos envolve mudanças na concentração de enzimas lipogênicas^(61,62,63,64), particularmente a ATP-citrato-liase, a enzima málica e a glicose-6-fosfato desidrogenase. Estas duas últimas participam na redução de

equivalentes de NADPH para a síntese *de novo* de ácidos graxos nos tecidos^(65,66,67,68). As atividades da EM e da G6PDH se encontram bem correlacionadas com a taxa de lipogênese sob várias condições⁽⁶⁹⁾.

Na etapa final da prenhez observa-se também, que a mãe tende a desenvolver hipoglicemia, o que é especialmente evidenciado em condições de jejum. Nestas mesmas condições estudos em mulheres⁽⁷⁰⁾ e em ratas prenhes⁽⁷¹⁾ têm mostrado um aumento na gliconeogênese, sendo este efeito manifestado principalmente quando o glicerol é utilizado como substrato⁽³¹⁾. Assim, a hipoglicemia gestacional ocorre como resultado da aumentada utilização de glicose devido a alta taxa de transferência placentar desse substrato⁽⁷²⁾, que é a fonte primária de energia para o feto, enquanto que o nitrogênio e a proteína se constituem em componentes essenciais para o crescimento e a síntese de novos tecidos fetais e maternos⁽⁷³⁾.

O acúmulo de proteínas durante a prenhez é essencial para o crescimento fetal e, tanto a síntese de proteínas como a retenção de nitrogênio, encontram-se aumentadas em ambos os compartimentos: materno e fetal⁽⁷³⁾. O balanço nitrogenado é melhorado e a proteína da dieta é utilizada de forma mais eficiente⁽⁷⁴⁾ ao final da prenhez. Nesta fase, a retenção de nitrogênio pode ser explicada pela ação do estrógeno e, principalmente, da progesterona, que tem ação inibitória sobre o catabolismo protéico⁽⁷⁵⁾.

A prenhez associada à restrição protéica determina alterações na homeostase materna, manifestada por relativa hiperlipidemia e menor responsividade à insulina, o que pode minimizar o impacto de um inadequado suprimento protéico para o crescimento fetal⁽⁷⁶⁾. Nestas mesmas condições tem sido observado um estado de resistência à leptina, no qual o consumo alimentar pode se manter estável ou mesmo aumentado, apesar das elevadas concentrações séricas desse hormônio^(77,41).

A desnutrição é caracterizada por um desequilíbrio e/ou deficiência de nutrientes no organismo, sendo considerada como um grave problema de saúde pública nos países em

desenvolvimento⁽⁷⁸⁾. Ocorrendo durante a prenhez, a desnutrição, tanto aguda^(79,80) quanto crônica^(81,82,83,84), vem sendo considerada como um fator determinante de retardo no desenvolvimento fetal⁽⁸⁵⁾. Desnutrição e anemia maternas são reconhecidas como as mais freqüentes causas de retardo no crescimento fetal humano, em países em fase de desenvolvimento social e econômico⁽⁸⁶⁾.

Estudos em modelos animais abordando o efeito da desnutrição tanto durante a prenhez como na lactação, demonstraram ocorrer comprometimento na massa corporal das mães, com conseqüente repercussão nas crias^(87,88). Em outro estudo, foi demonstrado que a desnutrição em períodos iniciais de desenvolvimento, pode modificar permanentemente o crescimento e o metabolismo, determinando alterações irreversíveis no tamanho e na função de órgãos, especialmente o fígado e o pâncreas⁽⁸⁹⁾, modificando a composição corporal e diminuindo a secreção de hormônios que atuam no crescimento fetal⁽⁷⁸⁾.

A desnutrição durante a prenhez em ratos pode reduzir a tolerância à glicose⁽⁹⁰⁾, devido à menor secreção de insulina estimulada por glicose⁽⁹¹⁾ e ao comprometimento no desenvolvimento das células beta pancreáticas^(90,92).

Alguns estudos desenvolvidos a partir das décadas de 1970 e 1980 procuraram associar a restrição nutricional materna e, principalmente a restrição protéica, não só com o retardo no crescimento intra-uterino das crias, mas também com a maior predisposição para o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta, particularmente a obesidade e o diabetes mellitus tipo 2⁽⁹³⁾.

No nosso laboratório, um estudo anterior desenvolvido por Macêdo et al.⁽⁹⁴⁾, com o objetivo de avaliar o efeito da dieta restrita em proteína na fase anabólica da prenhez (14º dia) em ratas, sobre as concentrações séricas de leptina e insulina, e o envolvimento desses hormônios no comportamento alimentar e no acréscimo de gordura corporal materna, mostrou redução na glicemia e na proporção dos depósitos de tecido adiposo branco gonadal como

efeito da prenhez, enquanto que a restrição protéica diminuiu a proporção de gordura na carcaça. Em todos os grupos as concentrações séricas de leptina e insulina foram similares e não se correlacionaram com a ingestão alimentar.

O objetivo deste estudo foi avaliar alguns parâmetros relacionados à síntese de ácidos graxos em ratas submetidas à restrição protéica na fase tardia da prenhez, considerando a escassez de estudos na literatura sobre os impactos dessa associação no organismo materno.

II. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar na fase tardia da prenhez se a restrição protéica materna promove alterações na velocidade de síntese de ácidos graxos em ratas.

2.2 Específicos:

» Monitorar a massa corporal, o consumo alimentar e a ingestão protéica de ratas controle e submetidas à restrição protéica durante o período experimental.

» Avaliar a massa, o conteúdo de lipídios e a velocidade de síntese de ácidos graxos no fígado, glândula mamária e no tecido adiposo branco gonadal.

» Avaliar o conteúdo de glicogênio e a atividade das enzimas glicose-6-P-desidrogenase, málica e ATP-citrato liase no fígado.

» Determinar as concentrações séricas de glicose, proteína, albumina e dos hormônios insulina, leptina, glucagon e prolactina.

» Determinar a massa da placenta, a massa e o número de fetos de ratas prenhes.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos/LABA, do Departamento de Alimentos e Nutrição/DAN, da Faculdade de Nutrição/FANUT, da Universidade Federal de Mato Grosso/UFMT, Cuiabá–MT, Brasil.

3.1 Animais e dietas

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), adotado pela UFMT⁽⁹⁵⁾.

Foram utilizadas ratos fêmeas da linhagem Wistar - *Rattus Novergicus*, variedade *Albinus*, ordem *Rodentia Mammalia*, família *Muridae*, com aproximadamente 90 dias e peso médio de 250g, que foram fornecidas pelo Biotério Central da UFMT.

O acasalamento foi realizado durante a noite, abrigando 4 fêmeas e 1 macho, em gaiolas coletivas de polipropileno, medindo 37,0 x 31,0 x 16,0 cm, sendo a prenhez confirmada por esfregaço vaginal e constatação da presença de espermatozóides.

De acordo com o estado fisiológico, as ratas foram divididas nos seguintes grupos: controle não-prenhe (CNP) e prenhe (CP)- ratas tratadas com dieta controle (17% de proteína) e hipoproteicas não-prenhe (HNP) e prenhe (HP)- ratas tratadas com dieta hipoprotéica (6% de proteína).

Os animais foram mantidos sob temperatura constante ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz claro/escuro (12/12h), tendo livre acesso à água e à dieta, do 1º ao 18º dia de prenhez (período experimental).

As dietas controle e hipoprotéica eram isocalóricas (15,74 kJ/g), recomendadas para roedores em fases de crescimento, gravidez e lactação, segundo as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN 93-G)⁽⁹⁶⁾ (Tabela 1). As dietas foram elaboradas na forma de pó, sendo os ingredientes secos pesados em balança marca Marte (modelo A500), com precisão de 0,01g, peneirados (malha 20) e homogeneizados. Preparou-se quantidade suficiente para atender toda a fase experimental, sendo acondicionadas em porções, em recipientes de polipropileno hermeticamente fechados e armazenadas a 5°C, para serem oferecidas aos animais gradualmente.

Tabela 1: Composição das dietas normoprotéica e hipoprotéica, utilizadas durante 18 dias de tratamento de ratas não-prenhes e prenhes dos grupos controle (CNP e CP) e hipoprotéico (HNP e HP).

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

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

¹Fornecidos por Corn Products of Brazil

3.2 Procedimentos Experimentais

3.2.1 Determinação do consumo alimentar, evolução da massa corporal e ingestão protéica

O consumo de dietas e a evolução da massa corporal das mães foram registrados três vezes por semana, durante os 18 dias de prenhez. O consumo alimentar absoluto foi calculado pela diferença entre a quantidade de ração oferecida e a dieta rejeitada após 48h, sendo as sobras peneiradas antes da sua pesagem. Para calcular o consumo relativo, considerou-se o consumo absoluto dividido pela massa corporal final de cada rata, em percentual, sendo os valores expressos em g.

A avaliação da massa corporal das mães foi realizada sempre pela manhã, sendo estas colocadas em recipiente de polietileno com tampa e pesadas em balança semi-analítica, marca Marte, (modelo A500), previamente tarada e com precisão de 0,01 g. Determinou-se a massa corporal, o consumo alimentar absoluto (g) e proporcional à massa corporal (g/100g).

Para o cálculo da ingestão total de proteína, considerou-se o consumo total de cada rata, relacionada à concentração de proteína de cada dieta oferecida (17% e 6%), sendo os valores expressos em g. A ingestão protéica relativa foi calculada considerando a ingestão protéica absoluta dividida pela massa corporal final de cada rata, em percentual, sendo os valores expressos em g/100g.

3.2.2 Coleta de amostras de sangue e de tecidos

Todos os procedimentos experimentais tiveram início às 7:00h e se estenderam por toda a manhã. Inicialmente, foram retiradas amostras de sangue para a determinação de glicose no estado alimentado, através de uma pequena incisão na extremidade inferior da cauda dos animais.

Para a medida da velocidade de síntese de ácidos graxos, foram injetados em cada animal intra-peritonealmente, 3mCi de $^3\text{H}_2\text{O}$ contidos em 0,3mL de salina, 60 minutos antes do sacrifício.

Os animais foram eutanasiados com CO_2 , sendo posteriormente decapitados, para a coleta de sangue, separando-se o soro e o plasma para avaliações bioquímicas, hormonais e para a determinação da atividade específica de $^3\text{H}_2\text{O}$.

Após laparotomia mediana foram retirados o tecido adiposo branco gonadal (GON), a glândula mamária (GMA), o fígado (FIG) e a carcaça (CARC), os quais foram pesados imediatamente para a obtenção da massa em valor absoluto (g) e relativo (g/100g de massa corporal), sendo armazenados em freezer à -80°C para análises posteriores. Também foi mensurada a massa da placenta de cada rata, e dos fetos foram obtidos o número e a massa em g.

3.3 Dosagens Bioquímicas e Hormonais

3.3.1 Determinações Bioquímicas

3.3.1.1 Glicose

Foi determinada utilizando monitor com tiras de teste para determinação da glicemia (glicosímetro) por fotômetro de refletância da marca *Accu-Chek®*, Laboratório Roche Diagnósticos, Alemanha. Os resultados foram expressos em mg/dL.

3.3.1.2 Proteínas Totais

A determinação de proteínas séricas totais foi realizada segundo o método de reativo de biureto modificado⁽⁹⁷⁾. O ensaio baseia-se na reação de íons cobre com as ligações peptídicas das proteínas séricas. A concentração de proteínas totais foi avaliada em espectrofotômetro modelo 395, marca Micronal, em comprimento de onda de 545 nm e os resultados foram expressos em g/dL.

3.3.1.3 Albumina

A concentração de albumina sérica foi determinada pelo método colorimétrico do verde de bromocresol⁽⁹⁸⁾ tamponado em pH 3,8, empregando *Kit* comercialmente disponível (Labtest). A concentração de albumina foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 630 nm, sendo os resultados expressos em g/dL.

3.3.2 Determinação dos hormônios: insulina, prolactina, leptina e glucagon

As concentrações séricas dos hormônios foram determinadas por ELISA, utilizando-se *Kits* comercialmente disponíveis: Insulina (*Rat Insulin Elisa Kit – Linco Research - USA*), sendo os resultados expressos em pg/mL; Prolactina (*Rat Prolactin EIA – ALPCO*

Diagnostics - USA) e os resultados foram expressos em ng/mL; Leptina (*Antigenix América's Leptin Elisa Construction Kit, Inc. USA*), e os resultados expressos em pg/mL; Glucagon (*Rat Glucagon Elisa Kit Wako – USA*), com os resultados expressos em pg/mL.

3.4 Determinação de glicogênio hepático

O conteúdo de glicogênio no FIG foi determinado segundo o método descrito por Sjögren et al. (1938)⁽⁹⁹⁾. Foram colocados 0,5g do respectivo tecido em tubos de centrífuga graduados, contendo 2,0mL de KOH a 30%. Os tubos foram então transferidos para um banho-maria à temperatura de 100° C durante 1 hora para a fase de digestão e adicionadas cinco gotas de Na₂SO₄ e álcool etanólico PA, de tal maneira que a solução apresentasse uma concentração suficiente para a extração do glicogênio. A dosagem foi então realizada mediante a adição do reagente de fenol. Tomando-se como referência uma curva padrão de glicose determinou-se o teor de glicose obtido nas amostras. Calculou-se, posteriormente, a concentração de glicogênio e os valores foram expressos em mg de glicogênio/100mg de peso fresco de tecido hepático.

3.5 Determinação do conteúdo de lipídios nos tecidos

A determinação do conteúdo de lipídios do GON, GMA e FIG foi realizada pelo método descrito por Folch et al. (1957)⁽¹⁰⁰⁾. Os tecidos foram colocados em solução de clorofórmio:metanol (2:1), homogeneizados e o volume completado para 10mL de solução. As amostras eram deixadas em “overnight” para a extração dos lipídios, sendo posteriormente filtradas. A uma alíquota de 8mL do filtrado eram adicionados 1,6mL de salina. Após separação da fase clorofórmica e aquosa, o material era centrifugado a 2500rpm durante 5 minutos. Uma alíquota da fase clorofórmica e aquosa do material era transferida para tubos previamente pesados e mantidos em capela para evaporação em temperatura ambiente. A

quantidade de gordura em gramas foi obtida pela diferença entre a pesagem do tubo após evaporação e a pesagem inicial (tubo vazio). Os valores foram expressos em mg de lipídio/100mg de peso fresco dos tecidos.

3.6 Determinação da atividade de enzimas no fígado

Um fragmento do FIG foi extraído, imediatamente armazenado em nitrogênio líquido e mantido em freezer a -80°C até sua utilização. Todos os procedimentos após a retirada do tecido foram realizados em gelo e para o ensaio das enzimas glicose-6-P-desidrogenase (G6PDH), enzima málica (EM) e ATP-citrato liase (ATP-Cit) foram utilizados os mesmos homogeneizados. Cada 0,5g de FIG foi homogeneizado em 5 ml de tampão Tris 10mM, pH 7,4 contendo sacarose 0,32M, EDTA 2mM e 2- β -mercaptoetanol 5mM e centrifugado por 10 minutos a 8.500rpm. A camada superior foi descartada e a fração sobrenadante centrifugada a 11.000rpm à temperatura de 4°C por duas horas, para obtenção da fração citosólica. As atividades das enzimas avaliadas foram expressas em nmol de NADP^{+} /mg de proteína.min. O conteúdo protéico do homogenado foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951)⁽¹⁰¹⁾.

3.6.1 Glicose-6-P desidrogenase (G6PDH)

A atividade da G6PDH foi medida em espectrofotômetro a 340nm, de acordo com o método de Lee (1982)⁽¹⁰²⁾ que se baseia na redução de NADP^{+} . A mistura de reação continha Tris 0,1M, pH 8,0, NADP^{+} 1mM e D-glicose-6-fosfato 1mM, à qual se adicionava a proteína citosólica. A reação foi iniciada pela adição de glicose-6-fosfato sendo omitida no branco.

3.6.2 Enzima málica (EM)

A atividade da EM foi avaliada medindo-se a formação de NADPH a partir de L-malato e NADP^{+} . O método utilizado foi descrito por Ochoa (1955)⁽¹⁰³⁾, e modificado por Hsu

e Lardy (1969)⁽¹⁰⁴⁾. A formação do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340nm e o ritmo de sua formação, foi proporcional à concentração da enzima. O sistema de ensaio continha tampão trietanolamina 67mM, L-malato 5mM, MnCl₂·4H₂O 4mM, NADP⁺ 0,2mM. A reação foi iniciada com L-malato, sendo omitida no branco.

3.6.3 ATP-citrato liase (ATP-cit)

O ensaio da ATP-cit foi realizado de acordo com o método descrito por Srere (1959)⁽¹⁰⁵⁾, acompanhando a oxidação do NADH⁺, em espectrofotômetro a 340nm por 3 minutos. A mistura da reação continha tampão trietanolamina 50mM, pH 7,7, ATP-Mg 7mM, citrato de potássio 10mM, NADH⁺ 0,1mM, 2-β-mercaptoetanol 10mM, coenzima A 0,24mM, NADH-malato desidrogenase 1U/ml. A reação foi iniciada pela adição de citrato de potássio e o NADH⁺ sendo omitido no branco.

3.7 Determinação da velocidade de síntese de ácidos graxos “in vivo” com ³H₂O

A determinação da velocidade de síntese de ácidos graxos (AG) foi medida no FIG, GON e GMA dos grupos avaliados, por meio da incorporação de ³H₂O em lipídios, segundo o método de Robinson et al (1978)⁽¹⁰⁶⁾. Esta técnica estima síntese de ácidos graxos, através da incorporação do ³H da água nas moléculas de lipídios, independente dos substratos fisiológicos (glicose, piruvato, aminoácidos, etc), que estejam sendo utilizados.

Para a medida da síntese de ácidos graxos, os animais receberam, intraperitonealmente 3mCi de ³H₂O em 0,3mL de salina. Após 60minutos foram eutanasiados com CO₂ e posteriormente decaptados para a coleta do sangue e determinação da atividade específica da ³H₂O no plasma.

Os tecidos eram homogeneizados e a extração dos lipídios foi realizada empregando-se clorofórmo:metanol 2:1 (Folch et al.,1957)⁽¹⁰⁷⁾ completando-se o volume para 10mL. Após

a extração, o material era filtrado e a 8mL do filtrado eram adicionados 1,6mL de solução salina (NaCl) 0,9%. As amostras eram então centrifugadas a 2500rpm por 10 minutos e a fase superior aquosa era aspirada, sendo a fase inferior lavada 3 vezes com a mistura da fase superior, preparada com clorofórmio, metanol e mistura salina na proporção de 21,1:337:330mL, respectivamente. A mistura salina era preparada com 0,528g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,732g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5,8g de NaCl e 940mL de H_2O . Uma alíquota de 2mL do extrato clorofórmico era evaporada e o resíduo dissolvido em 10mL do coquetel de cintilação Econo 22,5 para contagem da radiação dos lipídios totais.

Para o isolamento de ácidos graxos, uma alíquota de 4mL do extrato clorofórmico era separado para evaporação e os lipídios saponificados com 2mL de KOH etanólico (1mL de KOH saturado para 20mL de etanol). Os tubos eram fechados com tampas de vidros e submetidos a aquecimento em banho-maria à temperatura de 70-80°C por duas horas. Eram então, adicionados 3mL de água deionizada e os tubos mantidos à temperatura entre 40-50°C, até a evaporação da fração alcoólica. O material saponificado era então lavado 3 vezes com 6mL de éter de petróleo, para remoção dos lipídios não saponificáveis. Posteriormente, o material era acidificado com ácido perclórico (HClO_4) a 6% e os ácidos graxos extraídos com éter de petróleo. Todo o material etéreo era evaporado em capela e o resíduo era dissolvido em 10mL de coquetel de cintilação tolueno-PPO (0,5%), para contagem dos ácidos graxos (Migliorini & Linder, 1966)⁽¹⁰⁸⁾. A radioatividade incorporada foi medida em contador beta (Tri-Carb 2100 TR Parckard, A Canberra Company, Alemanha).

A velocidade de síntese de ácidos graxos foi determinada empregando a fórmula abaixo, sendo os resultados obtidos expressos em nmol de AG/h.:

$$\mu\text{mol de AG/h} = \frac{\text{DPM/g de tecido} \times \text{h} \times 10^6}{\text{DPM do plasma} \times 1620 \times 13,3}$$

3.8 Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados em média e erro-padrão da média (EPM) com o número de animais indicados entre parênteses.

Todas as análises foram submetidas ao teste de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias. Os resultados com variâncias heterogêneas e sem distribuição normal foram inicialmente transformados (logarítmica-Log₁₀, logarítmico neperiano-Ln, ou raiz quadrada da variável) para correção da heterogeneidade ou anormalidade. Ao comparar os grupos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) a dois fatores (estado nutricional e fisiológico), seguido por testes de comparações múltiplas de médias (Tukey HSD para grupos com n iguais e diferentes).

Quanto comparados apenas dois grupos, os valores obtidos foram avaliados pelo test-t de Student para amostras independentes, após as variâncias homogêneas e distribuição normal.

Em todas as análises estabeleceu-se um nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade de 5%.

Para a análise dos resultados utilizou-se o programa “*Statistic for Windows*”, versão 4.3 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

IV. RESULTADOS

Independente do estado nutricional, o consumo alimentar em termos absolutos foi maior no grupo de ratas prenhes ($p<0,001$). Quando expresso em proporção à massa corporal final, o consumo dos grupos HNP e HP foi similar ao CNP e CP. A ingestão protéica absoluta foi menor nos grupos restritos em proteína, comparados aos controles ($p<0,001$) e maior nos prenhes, em relação aos não-prenhes ($p<0,001$). Em termos relativos, nos grupos restritos em proteína ocorreu uma redução significativa na ingestão protéica ($p<0,001$) e no grupo CP a ingestão foi menor que no CNP. A massa corporal final das ratas prenhes foi mais elevada que a das não-prenhes ($p<0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2. Consumo alimentar absoluto e relativo, ingestão protéica absoluta e relativa e massa corporal inicial e final de ratas não-prenhes e prenhes tratadas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP) durante 18 dias de prenhez.

	GRUPOS (n=7)			
	CNP	CP	HNP	HP
Consumo absoluto (g)	280±10	344±18***	271±10	371±9***
Consumo relativo (g/100g)	107±3 ^b	96±3 ^a	98±3 ^{ab}	106±2 ^{ab}
Ingestão protéica absoluta (g)	48±1,77	58±3,09***	16±0,61 ^{###}	22±0,51*** ^{###}
Ingestão protéica relativa (g/100g)	18±0,5 ^c	16±0,5 ^b	6,0±0,2 ^a	6,0±0,1 ^a
Massa corporal inicial (g)	234±3	250±7	250±5	249±10
Massa corporal final (g)	260±4	358±9***	280±8	351±10***

Valores representam média ± EPM de 7 animais. ***p<0,001 comparado às ratas não prenhes (ANOVA a dois fatores). ^{###}p<0,001 comparado às ratas controle (ANOVA a dois fatores). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Teste de Tukey HSD; p<0,001).

A Tabela 3 apresenta as massas dos tecidos: FIG, GON, GMA e CARC. Em termos absolutos, no FIG, GON e CARC, a prenhez aumentou esse parâmetro (p<0,001; p<0,008 e p<0,001, respectivamente). Quando expresso em g/100g, observou-se que a massa do FIG aumentou em função da prenhez (p<0,02), mas foi reduzida pela restrição protéica (p<0,05). No entanto, no GON não ocorreu diferença significativa. A prenhez reduziu a massa proporcional da CARC (p<0,001).

Em valores absolutos e relativos, na GMA observou-se que tanto na restrição de proteínas ($p<0,005$ e $p<0,001$) como na prenhez ($p<0,001$ e $p<0,001$) ocorreu aumento desse parâmetro.

Tabela 3. Massa absoluta e relativa dos tecidos e da carcaça (g) de ratas não-prenhes e prenhes tratadas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP) durante 18 dias de prenhez.

GRUPOS (n=7)				
	CNP	CP	HNP	HP
g				
FIG	8,28±0,29	12,30±0,38***	8,09±0,41	11,35±0,37***
GON	11,46±0,81	18,01±1,83**	15,05±1,42	16,84±1,48**
GMA	5,45±0,37	12,70±0,97***	8,18±0,72 ^{##}	15,04±1,02*** ^{##}
CARC	188 ±2,77	218±3,99***	200±4,19	220±6,59***
g/100g				
FIG	3,20±0,12	3,44±0,05*	2,92±0,14 [#]	3,24±0,13* [#]
GON	4,43±0,35	4,99±0,41	5,38±0,37	4,75±0,30
GMA	2,09±0,13	3,53±0,19***	2,94±0,20 ^{###}	4,26±0,22*** ^{###}
CARC	72,71±0,56	61,09±0,69***	72,22±0,64	62,51±0,27***

Valores expressam média ± EPM de 7 animais. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ comparado às ratas não prenhes (ANOVA a dois fatores). [#] $p<0,05$, ^{##} $p<0,01$, ^{###} $p<0,001$ comparado às ratas controle (ANOVA a dois fatores).

As concentrações séricas de proteínas totais e albumina foram significativamente influenciadas pela prenhez e pela restrição protéica. Assim, ratas CP, HP e HNP apresentaram

hipoproteinemia e hipoalbuminemia, quando comparadas às ratas CNP ($p<0,001$; $p<0,001$ e $p<0,001$; $p<0,02$).

Ocorreu redução significativa nas concentrações séricas de glicose nos grupos de ratas prenhes ($p<0,001$), comparados aos não-prenhes e no grupo HNP a glicemia foi maior que no CNP. O conteúdo proporcional de glicogênio hepático foi significativamente menor nas ratas prenhes, comparadas às não-prenhes ($p<0,001$). No entanto, no grupo HP o conteúdo foi maior do que no CP (Tabela 4).

Tabela 4. Concentrações séricas de proteínas totais, albumina, glicose e glicogênio hepático em ratas não-prenhes e prenhes tratadas com dietas controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP) durante 18 dias de prenhez

	GRUPOS (n=7)			
	CNP	CP	HNP	HP
Proteínas Totais (g/dL)	6,4±0,11	5,6±0,17***	5,7±0,06 ^{###}	4,9±0,18 ^{####} ***
Albumina (g/dL)	2,8±0,05	2,3±0,09***	2,7±0,06 ^{##}	2,1±0,07 ^{###} ***
Glicose (mg/dL)	121±3 ^b	97±3 ^a	135±3 ^c	89±2 ^a
Glicogênio hepático (mg/100mg)	7,16±0,0	2,29±0,04 ^a	7,18±0,15 ^c	3,45±0,08 ^b

Os valores representam média ± EPM de 7 animais. *** $p<0,001$ comparado às ratas não prenhes (ANOVA a dois fatores). ^{##} $p<0,01$, ^{###} $p<0,001$ comparado às ratas controle (ANOVA a dois fatores). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Teste de Tukey HSD; $p<0,001$).

A restrição de proteínas ($p<0,04$) aumentou a velocidade de síntese de ácidos graxos no FIG, mas esta foi reduzida pela prenhez ($p<0,03$). Na GMA, o grupo HNP apresentou maior velocidade de síntese que os demais ($p<0,001$) e, no GON, ocorreu redução em função da prenhez ($p<0,036$) (Figura 1 e Tabela 5).

A atividade das enzimas G6PDH, EM e ATP-cit no fígado encontra-se descrita na Figura 2 e Tabela 6. A restrição protéica não modificou a atividade da enzima G6PDH, porém no grupo controle prenhe esta foi reduzida em relação aos demais ($p<0,005$). A atividade da EM foi significativamente aumentada pela restrição protéica e diminuída pela prenhez ($p<0,04$ e $p<0,03$).

A atividade da enzima ATP-cit foi semelhante nos grupos de ratas submetidas à restrição protéica (HNP e HP) ($p<0,04$), sendo estes maiores que o grupo CP e menores que o CNP ($p<0,04$).

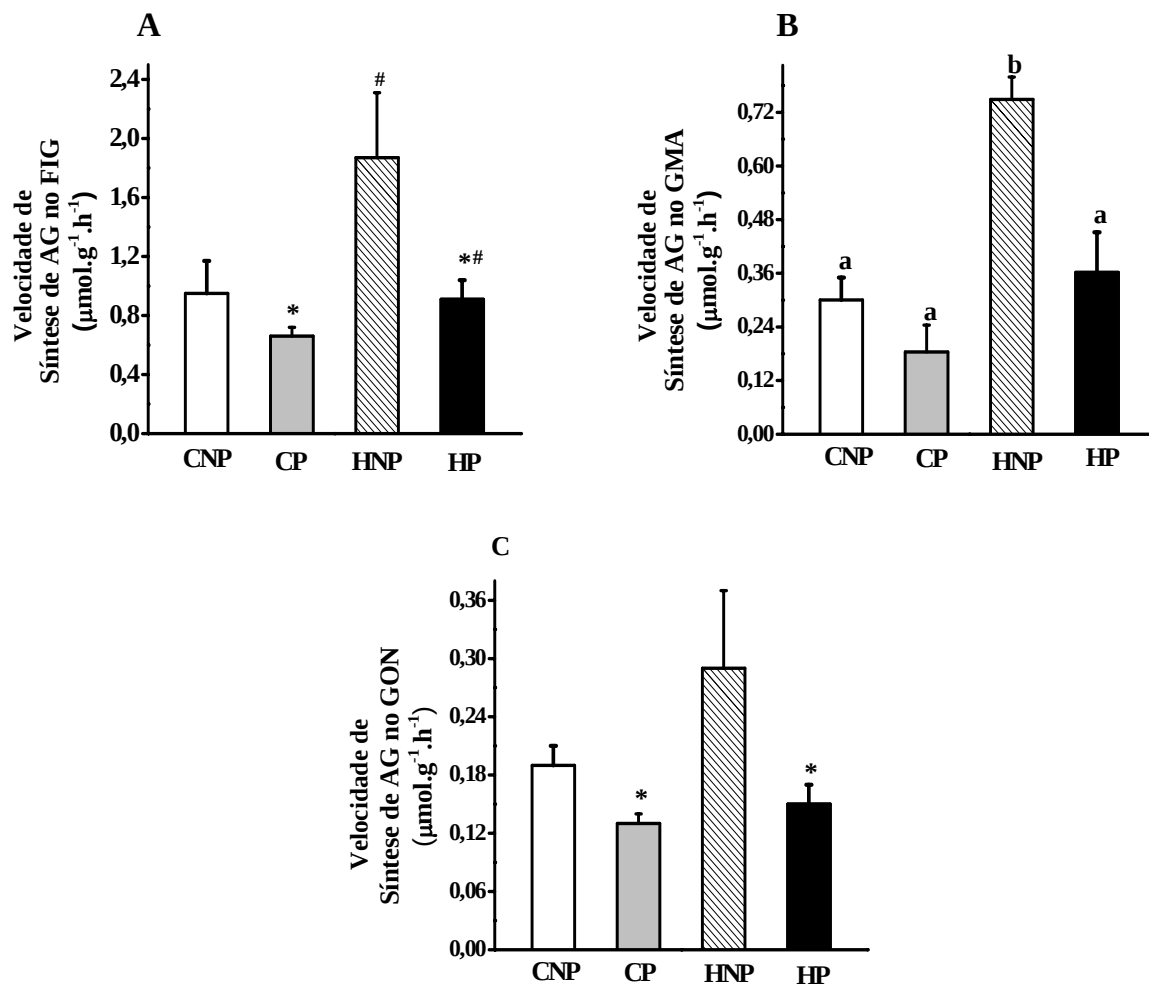


Figura 1. Velocidade de síntese de ácidos graxos medida pela incorporação de $^3\text{H}_2\text{O}$ no FIG (A), GMA (B) e GON (C) de ratas não-prenhes e prenhes tratadas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP) durante 18 dias de prenhez. Valores expressam média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado às ratas não prenhes (ANOVA a dois fatores). # $p < 0,05$ comparado às ratas controle (ANOVA a dois fatores). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Teste de Tukey HSD; $p < 0,05$).

Tabela 5. Velocidade de síntese de ácidos graxos medida pela incorporação de $^3\text{H}_2\text{O}$ no FIG, GON e GMA ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$) em ratas não-prenhes e prenhes, tratadas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP) durante 18 dias de prenhez.

	GRUPOS (n=5)			
	CNP	CP	HNP	HP
FIG	0,95±0,22	0,66±0,06*	1,87±0,44 [#]	0,91±0,13* [#]
GON	0,19±0,02	0,13±0,01*	0,29±0,08	0,15±0,02*
GMA	0,30±0,05 ^a	0,18±0,06 ^a	0,75±0,05 ^b	0,36±0,9 ^a

Valores expressam média ± EPM de 5 animais. *p<0,05 comparado às ratas não prenhes (ANOVA a dois fatores). [#]p<0,05 comparado às ratas controle (ANOVA a dois fatores).

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Teste de Tukey HSD; p<0,05).

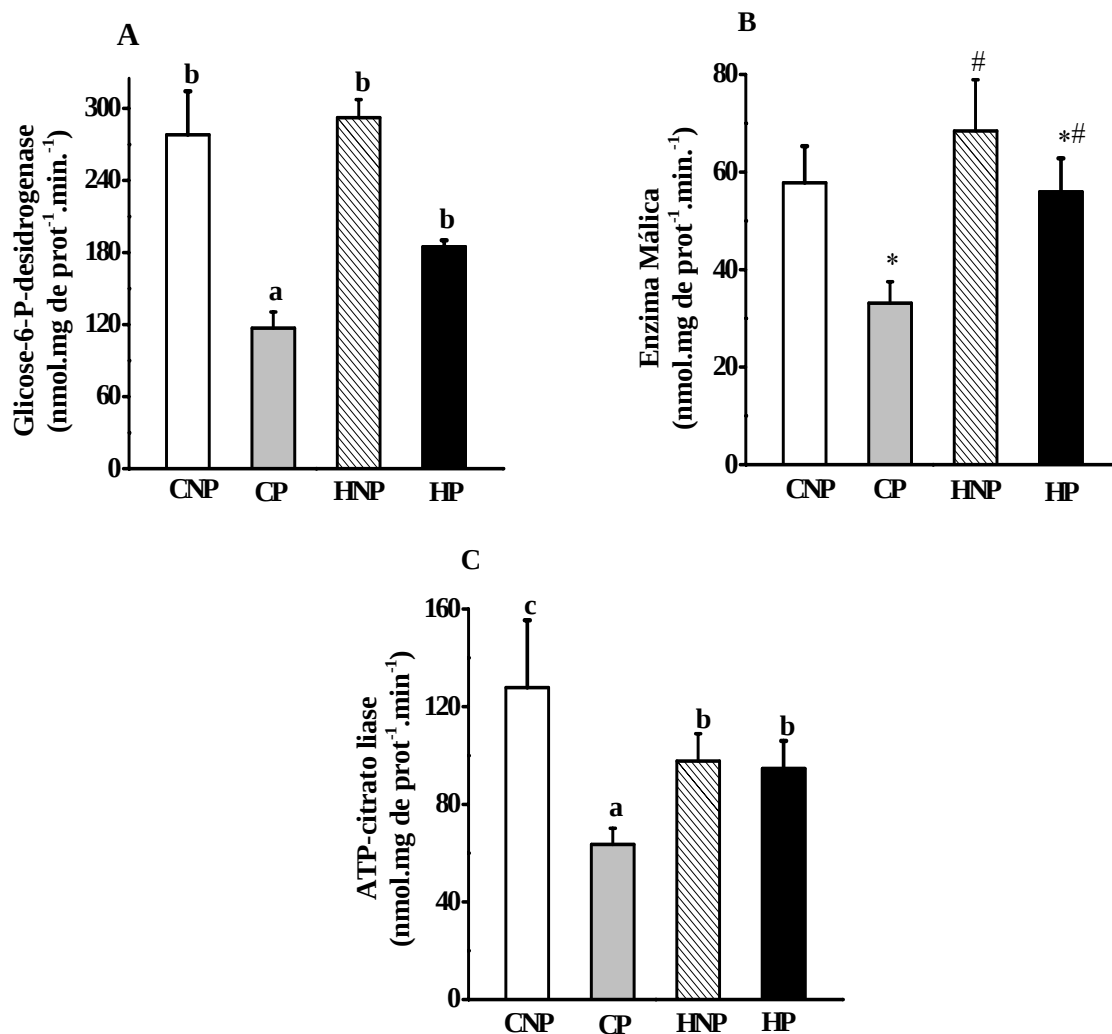


Figura 2. Atividade das enzimas G6PDH (A), EM (B), ATP-cit (C) no FIG de ratas não-prenhes e prenhes, tratadas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP) durante 18 dias de prenhez. Valores expressam média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado às ratas não prenhes (ANOVA a dois fatores). # $p < 0,05$ comparado às ratas controle (ANOVA a dois fatores). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Teste de Tukey HSD; $p < 0,05$).

Tabela 6. Atividade das enzimas lipogênicas no FIG (nmol.mg de prot.⁻¹ min⁻¹) de ratas não-prenhes e prenhes tratadas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP) durante 18 dias de prenhez.

	GRUPOS (n=5)			
	CNP	CP	HNP	HP
G6PDH	278±36 ^b	117±14 ^a	292±15 ^b	185±5 ^b
EM	58±8	33±4*	68±11 [#]	56±7 ^{#*}
ATP-cit	128±28 ^c	64±7 ^a	98±11 ^b	95±11 ^b

Valores expressam média ± EPM de 5 animais. *p<0,05 comparado às ratas não prenhes (ANOVA a dois fatores). [#]p<0,05 comparado às ratas controle (ANOVA a dois fatores).

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Teste de Tukey HSD; p<0,05).

A prenhez reduziu o conteúdo proporcional de lipídios no FIG e no GON (p<0,002 e p<0,001). Na GMA, tanto a prenhez como a restrição protéica, reduziram esse parâmetro (p<0,041 e p<0,020). Com relação à razão lipídio/glicogênio no FIG, houve aumento em função da prenhez (p<0,001) e redução com a restrição protéica (p<0,03) (Tabela 7).

Tabela 7. Conteúdo de lipídios no FIG, GON e GMA (mg/100mg) e Razão lipídio/glicogênio,

nas ratas dos grupos não-prenhes e prenhes tratadas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP) durante 18 dias de prenhez.

	GRUPOS (n=7)			
	CNP	CP	HNP	HP
FIG	5,92±0,15	3,94±0,08**	4,90±0,22	4,16±0,12**
GON	73,88±0,32	67,63±0,58***	70,93±0,21	67,21±0,37***
GMA	66,15±0,76	58,45±1,02*	57,48±1,61 [#]	52,72±0,71 ^{#*}
Razão lipídio/glicogênio	0,85±0,1	1,65±0,1***	0,75±0,1 [#]	1,18±0,1 ^{#***}

Valores expressam média ± EPM de 7 animais. *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,001 comparado às ratas não prenhes (ANOVA a dois fatores). [#]p<0,05 comparado às ratas controle (ANOVA a dois fatores).

A insulinemia foi mais elevada no grupo de ratas prenhes em relação às não-prenhes (p<0,005). No entanto, nas ratas hipoprotéicas prenhes esse aumento foi aproximadamente 50% menor que o valor encontrado nas ratas controles prenhes. Não ocorreu variação nas concentrações séricas de glucagon entre os grupos.

Quanto às concentrações de leptina e prolactina, estas foram influenciadas tanto pela restrição protéica (p<0,001 e p<0,007) como pela prenhez (p<0,001 e p<0,03). A restrição protéica elevou em cerca de cinco vezes a leptinemia e, no grupo de ratas prenhes, o HP apresentou aumento desse hormônio duas vezes maior comparado ao HNP. A prolactina aumentou acima de duas vezes nos grupos restritos em proteína (HP e HNP) em relação aos controles. A prenhez também provocou aumento significativo nas concentrações desse hormônio, sendo de 1,5 vezes no HP e de sete vezes no CP, comparados aos não-prenhes.

As razões insulina/glicose e insulina/glucagon foram significativamente maiores nas ratas prenhes em comparação às não-prenhes (p<0,002 e p<0,005) (Tabela 8).

Tabela 8. Concentrações séricas de insulina, glucagon, leptina e prolactina e razão insulina/glicose e insulina/glucagon, em ratas não-prenhes e prenhes tratadas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HNP e HP) durante 18 dias de prenhes.

	GRUPOS (n=5)			
	CNP	CP	HNP	HP
Insulina (pg/mL)	1590±380	4540±770 ^{**}	1570±370	2290±620 ^{**}
Glucagon (pg/mL)	440±100	800±100	450±100	530±100
Leptina (pg/mL)	2890±490	9000±179 ^{***}	17610±294 ^{###}	39810±450 ^{###***}
Prolactina (ng/mL)	0,5±0,1	3,8±1,5 [*]	4,6±1,3 ^{##}	7,0±1,4 ^{##*}
Razão insulina/glicose (pmol/L:mmol/L)	42,4±10,3	152,2±29,2 ^{**}	38,4±9,9	85,8±25,6 ^{**}
Razão insulina/glucagon (pmol/L)	2,1±0,3	3,6±0,2 ^{**}	2,1±0,3	2,5±0,4 ^{**}

Valores expressam média ± EPM de 5 animais. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 comparado às ratas não prenhes (ANOVA a dois fatores). #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 comparado às ratas controle (ANOVA a dois fatores).

A restrição protéica materna provocou redução nas massas da placenta e dos fetos quando comparado ao controle (p<0,001 e p<0,002). Entretanto, o número de fetos entre os grupos não foi alterado (Figura 3).

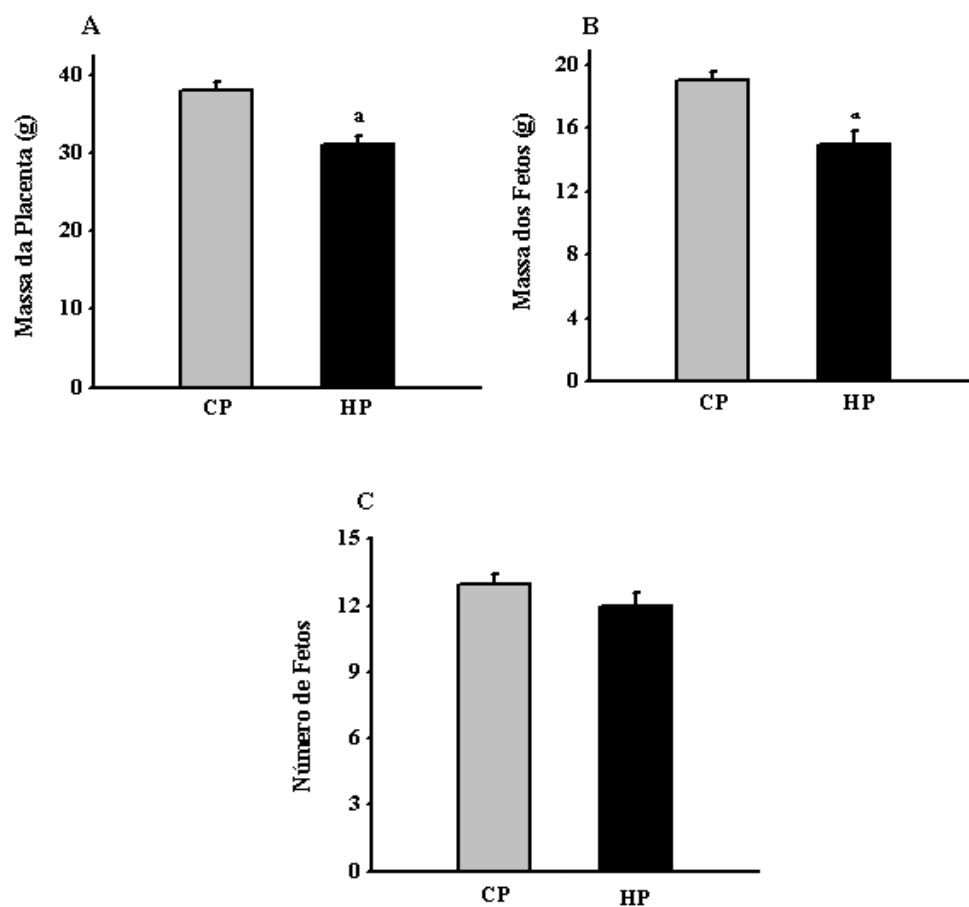


Figura 3. Massa (g) da placenta (A), dos fetos (B) e número de fetos (C) de ratas prenhes, tratadas com dieta controle (CP) ou hipoprotéica (HP) durante 18 dias de prenhez. Valores expressam média $\pm$ EPM de 7 animais. ^a $p < 0,001$ e ^a $p < 0,001$ comparado às ratas controle (Teste t-Student).

V. DISCUSSÃO

Embora a restrição protéica neste estudo tenha determinado elevação na velocidade de síntese de ácidos graxos e concomitante aumento na atividade da enzima málica no fígado, também provocou redução na massa relativa desse tecido e menor razão lipídio/glicogênio.

O aumento na velocidade da produção hepática de ácidos graxos, acompanhada da maior atividade da EM observada com a restrição protéica, mostra que a síntese de ácidos graxos *de novo* é bastante responsiva a mudanças na dieta. Alguns estudos na literatura mostram que o maior aporte de carboidratos estimula a síntese de ácidos graxos no fígado, aumentando as concentrações de triacilgliceróis no plasma^(109,110). Diferentes condições nutricionais e hormonais^(61,62,111,112) também podem alterar a atividade das enzimas lipogênicas no fígado, as quais podem ser estimuladas pela insulina e deprimidas pelo glucagon^(113,114,115).

Por outro lado, este estudo mostrou que a prenhez reduziu a velocidade de síntese de ácidos graxos e a atividade da EM, a deposição de lipídios e o conteúdo de glicogênio no fígado. Porém, elevou as massas total e percentual e a razão: lipídio/glicogênio nesse tecido. Foi observado ainda, redução na síntese de ácidos graxos e menor conteúdo de lipídios no GON, acompanhado de menor concentração de gordura na GMA.

A insulinemia apresentou elevação significativa nas ratas prenhes, independente da restrição protéica, assim como as razões: insulina/glicose e insulina/glucagon.

Como anteriormente relatado, a fase tardia da prenhez se caracteriza por intensa quebra dos estoques de lipídios, com lipólise acentuada no tecido adiposo^(5,6,7), acompanhada de reduzida captação de triacilgliceróis circulantes por esse tecido⁽²⁶⁾. Encontra-se bem documentado que o estado de hiperinsulinemia e resistência à insulina^(17,18,19,20), seria responsável pelas várias alterações metabólicas observadas nesse último estágio^(116,117). A insulinemia foi influenciada pela prenhez, sendo que sua concentração nestes grupos foi aproximadamente duas vezes mais elevada, comparada à dos não-prenhes. O aumento nas

concentrações plasmáticas de insulina e a diminuição da glicose encontradas nas ratas prenhes sugerem um estado de resistência à insulina típica da prenhez tardia, o que também pode ter sido confirmado pelo menor armazenamento de glicogênio no fígado, pela elevação das razões insulina/glicose e insulina/glucagon, como evidenciado em estudos anteriores^(118,1119,120,121).

Na fase catabólica da prenhez, a hipoglicemia ocorre em consequência da maior utilização de glicose, apesar da redução no consumo desse substrato pelos tecidos maternos^(116,122), o que ocorre em função do aumento de sua transferência para o feto, que corresponde à captação de 50% da glicose total utilizada pela mãe^(01,31,72,123,124).

Estudos recentes⁽³⁹⁾ demonstraram que a resistência à insulina no tecido adiposo pode ser explicada por mecanismos moleculares relacionados à redução da fosforilação de receptores da insulina (IR e IRS-1) em tirosina e ao aumento da fosforilação desses receptores em serina, o que reduz a tolerância à glicose. Alguns mecanismos relacionados com moduladores da função inflamatória também podem estar envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina na prenhez⁽¹²⁵⁾. Dentre estes, a adiponectina, quando em baixas concentrações no sangue e no tecido, poderia ser associada à maior resistência à insulina⁽³⁹⁾.

A leptinemia no presente estudo aumentou em função da restrição protéica sendo, entretanto, acentuadamente mais elevada quando associada à prenhez. A hiperleptinemia pode estar relacionada com a resistência à insulina na prenhez^(126,127), contribuindo para manter o consumo alimentar elevado, estimular o crescimento fetal e garantir as demandas para a lactação^(43,128,129,130).

Resistência à leptina também tem sido observada durante a prenhez, podendo estar associada com redução na expressão de receptores hipotalâmicos de leptina e à menor fosforilação do fator de transcrição (STAT3) no núcleo hipotalâmico ventromedial, que regula ao mesmo tempo a ingestão alimentar e o gasto de energia^(48,128,131).

Uma outra causa para explicar essa resistência pode estar relacionada com alterações hormonais características dessa fase, que inclui elevação nas concentrações de progesterona, prolactina, lactogênio placentário e, também de leptina, bem como na redução da elevação cíclica do estradiol sérico⁽¹³⁰⁾.

Consistente com o papel proposto da leptina como um fator de crescimento fetal, Smith & Waddell (2003) mostraram que a passagem transplacentar de leptina materna, que se encontra significativamente aumentada na fase final da prenhez, representa uma fonte importante desse hormônio para o feto. Existem evidências sugerindo que a produção de leptina na placenta, no tecido adiposo fetal e sua concentração na circulação materna em roedores, agem por ação de receptores de leptina fetais para regular o crescimento e desenvolvimento do feto. Assim, as concentrações de leptina séricas e do cordão umbilical encontram-se positivamente correlacionadas com o peso ao nascer e com a adiposidade neonatal⁽¹³²⁾.

Esse estado de resistência à leptina também foi observado no presente estudo nos grupos prenhes, o que favoreceu a manutenção do consumo alimentar e o desenvolvimento adequado das massas da placenta e dos fetos no grupo controle prenhe. Entretanto, no grupo HP, apesar da hiperleptinemia, a restrição protéica possivelmente interferiu, reduzindo as massas tanto da placenta, como dos fetos.

Adicionalmente, foi observado nas ratas, a ocorrência de hipoproteinemia e hipoalbuminemia, em consequência tanto da prenhez como da restrição protéica, porém isso não interferiu na massa corporal final. Alguns estudos mostram que a redução na ingestão alimentar durante a prenhez, ou a alteração na ingestão de proteínas é deletério à formação fetal e ao desenvolvimento da gravidez, podendo desencadear por vezes, quadros de desnutrição e nascimento de crias com massa corporal reduzida^(133,134,135).

Assim como a leptina, a prolactina apresentou aumento tanto em função da prenhez como da restrição protéica, sendo que no grupo prenhe restrito em proteína (HP), a concentração desse hormônio foi aproximadamente duas vezes maior que no controle.

As concentrações de prolactina materna encontram-se aumentadas durante os últimos dias de prenhez em ratas⁽⁵⁷⁾, sendo um fator importante para o desenvolvimento da glândula mamária, para o início e manutenção da lactação, além do seu envolvimento com outras funções, como o metabolismo lipídico e a modulação do sistema imune^(44,136), desempenhando um papel importante como potente imunoregulador, com propriedades pró-inflamatórias^(137,138,139). Estes dados encontram-se de acordo com o presente estudo, pois as ratas prenhes apresentaram aumento na massa total e percentual da glândula mamária, embora com menor concentração de gordura nesse tecido.

Conforme descrito por Gualillo et al. (1999)⁽⁴⁴⁾, a hiperprolactinemia na prenhez pode estimular a secreção de leptina no tecido adiposo branco materno e, dessa forma, participar da regulação da ingestão alimentar. Também foi demonstrado que a prolactina sérica elevada na etapa final da prenhez em ratas^(57,58,59) pode contribuir para a inibição da lipogênese hepática, possivelmente pela diminuição do suprimento de substratos para o fígado materno⁽⁶⁰⁾. Em estudo recente⁽¹⁴⁰⁾ foi observado que a hiperprolactinemia na gravidez tardia de ratas restritas em proteína, pode interferir na proliferação de hepatócitos e também induzir a resistência dos hepatócitos fetais a esse hormônio.

No presente estudo, a restrição protéica avaliada na fase final da prenhez, alterou a velocidade de síntese de ácidos graxos e a atividade de enzimas lipogênicas no fígado, a disponibilidade de lipídios para os tecidos, modificou o perfil hormonal e reduziu a massa da placenta e dos fetos, com interferência no desenvolvimento adequado da prenhez.

VI. REFERÊNCIAS

1. Mello MAR, Luciano E, Correa AF. Exercício em ratas jovens grávidas portadoras de desnutrição protéica: efeitos sobre o metabolismo glicídico. Rev. Bras. Cien. Mov. 2002;10(2):55-62.
2. Oller do Nascimento CM, Dâmaso AR. Efeitos do Exercício realizado durante o ciclo reprodutivo sobre o metabolismo lipídico: análise de estudos utilizando animais experimentais. Rev. Paul. Educ. Fis., jan./jun.1998;12(1):54-70.
3. Villar J, Cogswell M, Kestler E, Castillo P, Menendez R, Repke JT. Effect of fat and fat-free mass deposition during pregnancy on birth weight. Am. J. Obstet. Gynecol. 1992;167:1344-1352.
4. Lopez-Luna P, Munoz T, Herrera E. Body fat in pregnant rats at mid- and late-gestation. Life Sci. 1986;39:1389-1393.
5. Chaves JM, Herrera E. In vitro glycerol metabolism in adipose tissue from fasted pregnant rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978;85:1299-1306.
6. Knopp RH, Herrera E, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. VIII. Metabolism of adipose tissue isolated from fed and fasted pregnant rats during late gestation. J. Clin. Invest. 1970;49:1438-1446.
7. Martin-Hidalgo A, Holm C, Belfrage P, Schotz MC, Herrera E. Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy. Am. J. Physiol. 1994;266:E930-E935.

8. Buch I, Hornnes PJ, Kuhl C. Glucose tolerance in early pregnancy. *Acta. Endocrinol. (Copenh)*. 1986;112:263-266.
9. Ramos P, Crespo-Solans MD, Del Campo S, Herrera E. Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003;285:E318-E328.
10. Herrera E. Metabolic Changes in Diabetic Pregnancy. *Front. Diabetes*. 2005;17:34-45.
11. King JC, Butte NF, Bronstein MN, Kopp LE, Lindquist SA. Energy metabolism during pregnancy: influence of maternal energy status. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994;59:439S-445S.
12. Palacin M, Lasunción MA, Asunción M, Herrera E. Circulating metabolite utilization by periuterine adipose tissue in situ in the pregnant rat. *Metabolism*. 1991;40:534-539.
13. Knopp RH, Boroush MA, O Sullivan JB. Lipid metabolism in pregnancy. II. Postheparin lipolytic activity and hypertriglyceridemia in the pregnancy rat. *Metabolism*. 1975;24:481-493.
14. Alvarez JJ, Montelongo A, Iglesias A, Lasunción MA, Herrera E. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. *J. Lipid. Res.* 1996;37:299-308.

15. Lane MD, et al. Insulin-receptor tyrosine kinase and glucose transport. *Diabetes Care*.1990;13:565-575.
16. Nakae J, Accilli D. The mechanism of insulin action. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab*. 1999;12:721-731.
17. Herrera E, Amusquivar E, López-Soldado I, Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm. Res*. 2006;65:59-64.
18. Ryan EA, Sullivan MJ, Skyler JS. Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes*. 1985;34:380-389.
19. Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR, Calles J, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am. J. Physiol*. 1993;264:E60-E67.
20. Buchanan TA, Metzger BE, Freinkel N, Bergman RN. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *Am. J. Obstet. Gynecol*.1990; 162:1008-1014.
21. Elliott JA. The effect of pregnancy on the control of lipolysis in fat cells isolated from human adipose tissue. *Eur. J. Clin. Invest*. 1975; 5:159-163.

22. Sivan E, Homko CJ, Chen XH, Reece EA, Boden G. Effect of insulin on fat metabolism during and after normal pregnancy. *Diabetes*. 1999;48:834-838.
23. Williams C, Coltart T. Adipose tissue metabolism in pregnancy: the lipolytic effect of human placental lactogen. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1978;85:43-46.
24. Freinkel N, Herrera E, Knopp RH, Ruder HJ. Early diabetes. Camarini DR, Cole, HS. (eds.) New York: Academic, 1970.
25. Knopp RH, Herrera E, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. VIII. Metabolism of adipose tissue isolated from fed and fasted pregnant rats during late gestation. *J. Clin. Invest.* 1970;49:1438-1446.
26. Herrera E, Gomez-Coronado D, Lasunción MA. Lipid metabolism in pregnancy. *Biol. Neonate*. 1987;51:70-77.
27. Herrera E, Bonet B, Lasunción MA. Fetal and neonatal physiology. Polin RA and Fox WW. WB. Philadelphia: Saunders, 1998.
28. Mampel T, Villarroja F, Herrera E. Hepatectomy–nephrectomy effects in the pregnant rat and fetus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985;131:1219-1225.
29. Mason TM. The role of factors that regulate the synthesis and secretion of very low density lipoprotein by hepatocytes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1988;35:461-487.

30. Herrera E, Dodds P. Dietary fat, pregnancy and the prevention of heart disease; in Arnoldi A (ed): *Functional Foods, Cardiovascular Disease and Diabetes*, 1 ed. Cambridge and Boca Raton, Woodhead Publishing Limited and CRC Press. 2004; 283-306.
31. Herrera E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2000;54:S47-S51.
32. Montelongo A, Lasunción MA, Pallardo LF, Herrera E. Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes.* 1992;41:1651-1659.
33. Jovanovic L, Metzger BE, Knopp RH, Conley MR, Park E, Lee YJ, Simpson JL, Holmes L, Aarons JH, Mills JL, et al. The diabetes in early pregnancy study – hydroxybutyrate levels in type 1 diabetic pregnancy compared with normal pregnancy. *Diabetes. Care.* 1998;21:1978-1984.
34. Flint DJ, Sinnett-Smith PA, Clegg RA, Vernon RG. Role of insulin receptors in the changing metabolism of adipose tissue during pregnancy and lactation in the rat. *Biochem. J.* 1979;182:421-427.
35. Sutter-Dub MT, Sfaxi A, Latrille F, Sodoyez-Goffaux F, Sodoyez JC. Insulin binding and action in adipocytes of pregnant rats: evidence that insulin resistance is caused by post-receptor binding defects. *J. Endocrinol.* 1984;102:209-214.

36. Saad MJA, Maeda L, Brenelli SL, Carvalho CRO, Paiva RS, Velloso LA. Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnancy rats. *Diabetol.* 1997; 40:179-186.
37. Friedman JE, Ishizuka T, Shao J, Huston L, Highman T, Catalano P. Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes.* 1999;48:1807-1814.
38. Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L, Qiao L, Friedman JE. Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002;282:E522-E533.
39. Sevillano J, Castro J, Bocos C, Herrera E, Ramos PM. Role of insulin receptor substrate-1 serine 307 phosphorylation and adiponectin in adipose tissue insulin resistance in late pregnancy. *Endocrinology.* 2007;148(12):5933-5942.
40. Augustine RA, Grattan DR. Induction of central leptin resistance in hyperphagic pseudopregnant rats by chronic prolactin infusion. *Endocrinol.* 2008;149:1049-1055.
41. Seeber RM, Smith JT, Waddell BJ. Plasma leptin binding activity and hypothalamic leptin receptor expression during pregnancy and lactation in the rat. *Biol. Reprod.* 2002;66:1762-1767.
42. Henson MC, Castracane VD. Leptin in pregnancy. *Biol. Reprod.* 2000;63:1219-1228.

43. Ladyman SR, Grattan DR. Region-specific reduction in leptin-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in the rat hypothalamus is associated with leptin resistance during pregnancy. *Endocrinol.* 2004;145:3704-3711.
44. Gualillo O, Lago F, Garcia M, Menendez C, Senaris R, Casanueva FF, Dieguez C. Prolactin stimulates leptin secretion by rat white adipose tissue. *Endocrinol.* 1999; 140:5149-5153.
45. Woodside B. Prolactin and the hyperphagia of lactation. *Physiol. Behav.* 2007; 24:91:375-82.
46. Tong YA, Zhao HF, Labrie F, Pelletier G. Ontogeny of prolactin mRNA in the rat pituitary gland as evaluated by in situ hybridization. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1989;67:11-16.
47. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr. Rev.* 1996;17:639-649.
48. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 2000;80:1523-1531.
49. Reber PM. Prolactin and immune modulation. *Am. J. Med.* 1993;95:637-644.
50. Matera L. Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. *Life Sci.* 1996;59:599-614.

51. Matera L. Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunomodulation* 1997;4:171-180.
52. Jarrett JC, Ballejo G, Saleem TH, Tsibris JCM, Spellacy WN. The effect of prolactin and relaxin on insulin binding by adipocytes from pregnant women. *Am. J. Obst. Gynecol.* 1984;149:250-255.
53. Ryan EA, Enns L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988;67:341-347.
54. Hamosh M, Clary TR, Chernick SS, Scow RO. Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochem. Biophys. Acta.* 1970;210:473-482.
55. Flint DJ, Clegg RA, Vernon RG. Prolactin and the regulation of adipose tissue metabolism during lactation in rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1981;22:265-275.
56. Jensen DR, Gavigan S, Sawicki V, Witsell DL, Eckel RH, Neville MC. Regulation of lipoprotein lipase activity and mRNA in the mammary gland of the lactating mouse. *Biochem. J.* 1994;298:321-327.
57. Benito M, Lorenzo M, Medina JM. Relationship between lipogenesis and glycogen synthesis in maternal and foetal tissues during late gestation in the rat. Effect of dexamethasone. *Horm. Metab. Res.* 1982a;14:614-615.
58. Forsyth IA. The biology of the placental prolactin/growth hormone gene family. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 1991;13:97-148.

59. Yuen BH, Cannon W, Lewis J, SYL, Woolley S. A possible role for prolactin in the control of human chorionic gonadotropin and estrogen secretion by the fetoplacental unit. *Am. J. Obst. Gynecol.* 1993;136:286-291.
60. Agius L, Robinson AM, Girard JR, Williamson DH. Changes in the composition of mammary tissue, liver and muscle of rat dams during lactation and after weaning. *Biochem. J.* 1979;180:689-692.
61. Lakshmanan MR, Nepokroeff CM, Porter JW. Induction of fatty acid synthetase and acetyl-CoA carboxylase by isolated rat liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1972; 69:3516-3519.
62. Craig MC, Porter JW. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1973;159:606-614.
63. Nepokroeff CM, Lakshmanan MR, Ness GC, Muesing RA, Kleinsek DA, Porter JW. Carbohydrate metabolism in cultured animal cells *Arch. Biochem. Biophys.* 1974;162: 340-344.
64. Roncari DAK, Murthy WK. Lipogenesis and cholesterologenesis de novo in liver and adipose. *J. Biol. Chem.* 1975;250:4134-4138.
65. Towle HC, Mariachu CN, Oppenheimer JH. Synergism of thyroid hormone and high carbohydrate diet in the induction of lipogenic enzymes in the rat. *Mech. Implic.* 1980;19:579-585.

66. Siddiqui VA, Goldflam T, Goodridge AG. Nutritional and hormonal regulation of the translatable levels of malic enzyme and albumin mRNAs in avian liver cells in vivo and in culture. *J. Biol. Chem.* 1981;256:454-869.
67. Miksicek RJ, Towle HC. Changes in the rates of synthesis and messenger RNA levels of hepatic glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases following induction by diet or thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* 1982;257:11829-11835.
68. Goodridge AG, Fish J, Glynias MJ. Applications of recombinant DNA technology to studies of metabolic regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1984;224:6354-6371.
69. Lobato MF, Ros M, Moreno FJ, García-Ruiz JP. Nutritional and hormonal regulation of malic enzyme synthesis in rat mammary gland. *Biochem. J.* 1986;236:441-445.
70. Kalhan S, Rossi K, Gruca L, Burkett E, O'Brien A. Glucose turnover and gluconeogenesis in human pregnancy. *J. Clin. Invest.* 1997;100:1775–1781.
71. Herrera E, Knopp RH, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. VI. Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis and nitrogen metabolism during gestation in the fed and fasted rat. *J. Clin. Invest.* 1969;48:2260-2272.
72. Herrera E, Lasunción MA, Palacín M, Zorzano A, Bonet B. Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes.* 1991;40:83-88.
73. Satish CK. Protein metabolism in pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 71:1249S-1255S.

74. Mojtahedi M, Groot LCPGM, Boekholt HA, Raaij JMA. Nitrogen balance of healthy dutch women before and during pregnancy. *Am.J. Clin. Nutr.* 2002;75:1078-1083.
75. Naismith DJ, Fears RB. Adaptations in the metabolism of protein during pregnancy in the rat. *Proc. Nutr. Soc.* 1971;31:38A.
76. Sugd MC, Holness MJ. Modulation of in vivo insulin action by dietary protein during pregnancy. *Am. J. Physiol.* 1995;268:E722-E729.
77. Fangyan Du, Higginbothan DA, Douglas BW. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low protein diets. *Faseb. J.* 1999;213:A225.
78. Patrício FRS, Nóbrega FJ, Tonete SSQ. Desnutrição intra-uterina em diferentes períodos de gestação em ratas: estudo do intestino delgado proximal ao nascimento e durante a recuperação nutricional. *Ver. Paul. Pediatr.* 1984;2:43-52.
79. Antonov AN. Children born during the siege of Leningrad in 1942. *J. Pediatr.* 1947;30:250-259.
80. Smith CA. Effects of maternal undernutrition upon newborn infants in Holanda. *J. Pediatr.* 1947;30:229-243.
81. Galdino RS, et al. Desnutrição protéico-calórica. Dâmaso A. Nutrição e exercício na prevenção de doenças. *RJ. Medsi.* 2001;255-275.

82. Mello MAR, Cury L. Maternal adaptations for fetal growth in young malnourished rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1988;21:1053-1056.
83. Mello MAR, Oliveira-Filho RM, Cury L, Valle LBS. Pregnancy in young rats. Effects of malnutrition. *Nutr. Rep. Int.* 1987;36:527-535.
84. Mello MAR. Effect of exercise during pregnancy and dam age on maternal blood chemistry and fetal growth. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1992;25:537-542.
85. Mello MAR, Luciano E, Correa AF. Exercício em ratas jovens grávidas portadoras de desnutrição protéica: efeitos sobre o metabolismo glicídico. *Ver. Bras. Cien. Mov.* 2002;10:55-62.
86. Mahajan SD, Singh S, Shah P, Gupta N, Kochupillai N. Effect of maternal malnutrition and anemia on the endocrine regulation of fetal growth. *Endocr. Res.* 2004;30:189-203.
87. McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptional and foetal nutrition. *Bas. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2008;102:82-89.
88. Schuler SL, Gurmini J, Cecílio WAC, Azevedo MLV, Olandoski M, Noronha L. Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat. *Dams. J Parent. Enter. Nutr.* 2008;32:184-189.

89. Minana-Solis MC, Escobar C. Increased susceptibility to metabolic alterations in Young adult females exposed to early malnutrition. *Int. J. Biol. Sci.* 2007;3:12-19.
90. Husted SM, Nielsen MO, Tygesen MP, Kiani A, Blache D, Ingvarsen KL. Programming of intermediate metabolism in young lambs affected by late gestational maternal undernourishment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007;293:E548-E557.
91. Barker DJP. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paed. Suppl.* 2004;446:26-33.
92. Brennan KA, Olson DM, Symonds ME. Maternal nutrient restriction alters renal development and blood pressure regulation of the offspring. *Proc. Nutr. Soc.* 2006;65:116-124.
93. Desai M, Babu J, Ross MG. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007; 293:6:2306-314.
94. Macêdo GS, Ferreira CLP, Menegaz A, Arantes VC, Veloso RV, Carneiro EM, Boschero AC, Oller do Nascimento CMP, Latorraca MQ, Gomes-da-Silva MHG. Correlation of serum leptin and insulin levels of pregnant protein-restricted with predictive obesity variables. *Braz. J. Med. Biol. Res.* (In Press).
95. Manual para Técnicos em Laboratórios – Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). 2^a edição. 1996.

96. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 1993;123(6):1939-1951.
97. Wolfson WQ, Cohn C, Calvary F, Ichiba F. Studies in serum proteins 5. A rapid procedure for the estimation of total protein, true albumin, total globulin, alpha globulin, and gamma globulin in 1.0ml of serum. *Am. J. Clin. Pathol.* 1948;18:723-730.
98. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurements of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta.* 1971;31:87-96.
99. Sjögren B, Koning WA, Holmgeen H, Möllersöm EJ. Betrag zur Kennynies der leberthymik (glycogen, phosphor und calcium in des kaninchenleber). *Pflüger Arch. Ges. Physiol.* 1938;240:427-436.
100. Folch J, Less M, Stanley GA. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957;226:497-509.
101. Lowry OH. Protein measurement with of the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193: 265-268.
102. Lee CY. Glucose-6-phosphate dehydronase from mouse. *Meth. Enzymol.* 1982; 89: 252-257.
103. Ochoa S. *Meth. Enzymol.* Academic Press, Inc., New York, 1955;1:739-753.

104. Hsu RY, Lardy HA. Malic enzyme. *Methods Enzymol. J. Biol. Chem.* 1969;213-230.
105. Srere PA. The citrate cleavage enzyme. Distribution and purification. *J. Biol. Chem.* 1959;234:2544-2547.
106. Robinson AM, Girard JR, Williamson DH. Evidence or a role of insulin regulation of lipogenesis in lactating rat mammary gland. measurements of lipogenesis in vivo and plasma hormone concentrations in response to starvation and refeeding. *Bioch. J.* 1978; 170:609-613.
107. Folch J, Less M, Stanley GA. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957;226:497-509.
108. Migliorini RH, Linder C. Oxytocin and lipogenesis by tissue adipose in vitro. *Biochem. Biophys. Acta.* 1966;125:392-397.
109. Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 1994;35:1076-1084.
110. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 1999;103:1489-1498.
111. Hardie DG. Molecular aspects of cellular regulation (Cohen,P.,ed.). Amsterdam: Elsevier/North-Holland. Biochem. Press. 1980;1:32-62.

112. Romsos DR, Leveille GA. Effect of diet on activity of enzymes involved in fatty acid and cholesterol synthesis. *Adv. Lipid Res.* 1974;12:97-146.
113. Miller P, Singh A, Orci L, Jeanrenaud B. Nitrogen handling in adult hypothalamic obese rats. *Biochem. Biophys. Acta.* 1976; 428:480-494.
114. Geelen MJH, Beynen AC, Christiansen RZ, Lepreau-Jose MJ, Gibson DM. Modification of glycogen synthase activity in isolated rat hepatocytes by tumor-promoting phorbol esters: evidence for differential regulation of glycogen synthase and phosphorylase. *Febs. Lett.* 1978;95:326-330.
115. Witters LA, Moriarity D, Martin DB. Microsomal acetyl-CoA carboxylase: evidence for association of enzyme polymer with liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 1979;254:6644-6649.
116. Ramos P, Herrera E. Reversion of insulin resistance in the rat during late pregnancy by 72-h glucose infusion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1995;269: E858–E863.
117. Ramos P, Herrera E. Comparative responsiveness to prolonged hyperinsulinemia between adipose-tissue and mammary gland lipoprotein lipase activities in pregnant rats. *Early Pregnancy.* 1996;2:29-35.
118. Frizzell RT, Hendrick GK, Biggers DW, Lacy DB, Donahue DP, Green DR, Carr RK, Williams PE, Stevenson RW, Cherrington AD. Role of gluconeogenesis in sustaining glucose production during hypoglycemia caused by continuous insulin infusion in conscious dogs. *Diabetes.* 1998;37:749-759.

119. Rossi G, Lapaczewski P, Diamond MP, Jacob RJ, Shulman GI, Sherwin RS. Inhibitory effect of pregnancy on counterregulatory hormone responses to hypoglycemia in awake rat. *Diabetes*. 1993;42:1440-1445.
120. Cryer PE, Davis SN, Shamoon H. Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26:1902-1912.
121. Havel PJ, Parry SJ, Stern JS, Akpan JO, Gingerich RL, Taborsky GJ, Curry DL. Redundant parasympathetic and sympathoadrenal mediation of increased glucagon secretion during insulin-induced hypoglycemia in conscious rats. *Metab. Clin. Exp.* 1994; 43:860-866.
122. Martin A, Zorzano A, Caruncho I, Herrera E. Glucose tolerance tests and “in vivo” response to intravenous insulin in the unanaesthetized late pregnant rat and their consequences to the fetus. *Diabetes Metab.* 1986;12:302-307.
123. Herrera E, Palacin M, Martin A, Lasuncion MA. Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. *Diabetes*. 1985;34:42-46.
124. Lasuncion MA, Lorenzo J, Palacin M, Herrera E. Maternal factors modulating nutrient transfer to fetus. *Biol. Neonate*. 1987;51:86-93.

125. Di Benedetto A, Russo GT, Corrado F, Di Cesare E, Alessi E, Nicocia G, D'Anna R, Curcinotta D. Inflammatory markers in women with a recent history of gestational diabetes mellitus. *J. Endocrinol. Invest.* 2005;28:34-38
126. Williamson DH, Lund P. Cellular mechanisms for the regulation adipose tissue lipid metabolism during pregnancy and lactation. In: Allen I, King J, Lnnerdal B, editors. *Nutrient regulation during pregnancy, lactation and infant growth.* New York. Plenum. Press. 1994;39-64.
127. Cohen B, Novick D, Rubinstein M. Modulation of insulin activities by leptin. *Science.* 1996;274:1185-1188.
128. Grattan DR, Ladyman SR, Augustine RA. Hormonal induction of leptin resistance during pregnancy. *Physiol. Behav.* 2007;91:366-374.
129. Ladyman SR. Leptin resistance during pregnancy in the rat. *J. Neuroendocrinol.* 2008;20:269-277.
130. Augustine AR, Grattan DR. Induction of central leptin resistance in hyperphagic pseudopregnant rats by chronic prolactin infusion. *Endocrinology.* 2008;149:1049-1055.
131. Ladyman SR, Grattan DR. Suppression of leptin receptor messenger Ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat. *Endocrinology.* 2005;146:3868-3874.

132. Smith TJ, Waddell JB. Leptin distribution and metabolism in the pregnant rat: transplacental leptin passage increases in late gestation but is reduced by excess glucocorticoids. *Endocrinology*. 2003;144:3024-3030.
133. Galdino RS, Roston MMA. Efeitos da ingestão de dieta hipoprotéica e de exercício físico moderado sobre a evolução da gestação e o desenvolvimento fetal em ratas jovens. *Rev. Paul. Educ. Fis.* 2000;14:118-127.
134. Mello MAR, Almeida PBL. Desnutrição protéica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo. *Rev. Bras. Educ. Fis. Esp. SP.* 2004;18:17-30.
135. Twinn FSD, Ozanne ES, Ekizoglou S, Doherty C, James L, Gusterson B, Hales NC. The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. *Br. J. Nutr.* 2003;90:815-822.
136. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrinol. Res.* 1998;19:225-268.
137. Rohner JRF, Cusin I, Sainsburg A, Zakrewska KE, Jean RB. The loop between NPY and leptin in normal and obese rodents. *Horm. Metab. Res.* 1996;28:642-648.
138. Ben Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, function and clinical aspects. *Endocrinol. Res.* 1996;17:639-669.

139. Meli R, Gualillo O, Mattace RG, Di Carlo R. Further evidence for the involvement of prolactin in the inflammatory response. *Life Sci.* 1993;53:105-110.
140. Khattabi IE, Remacle C, Reusens B. The regulation of IGFs and IGFBPs by prolactin in primary culture of fetal rat hepatocytes is influenced by maternal malnutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006;291:E835-E842.