

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**EFEITOS DE DIFERENTES MODELOS DE DESNUTRIÇÃO SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS HEPÁTICOS, PLASMÁTICOS E
CEREBELARES DE RATOS DE 21 DIAS.**

ANA CLAUDIA MOREIRA BORTOLINI

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry

Co-orientadora: Dra. Liane Nanci Rotta

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, com área de concentração em Bioquímica, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas-Bioquímica.

Porto Alegre, 2005

AGRADECIMENTOS

Agradeço a grande oportunidade de realizar este trabalho ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, aos funcionários do Departamento de Bioquímica e à Cléia, pela dedicação e profissionalismo.

Aos professores deste departamento pelo apoio a minha formação profissional e pessoal.

À Liane pela ajuda indispensável, ética profissional e amizade.

À Tati, Carol, Fabi, Luciane e Karine, pelo grande companheirismo.

À Professora Ana Maria Brusque e ao Professor Clóvis, pelo incentivo profissional.

À Rosangela, pela luz e compreensão.

Ao meu pai por todos os esforços dispensados para tornar possível meu estudo.

Ao meu marido, companheiro e grande amor Luciano por incontáveis formas de apoio, carinho e atenção.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
I – INTRODUÇÃO	1
1 - Aspectos gerais sobre a desnutrição	1
1.1 - Desnutrição e SNC	3
1.2 - Efeitos da metionina nos ratos em desenvolvimento	4
1.3 - Cerebelo	8
1.4 - Fígado.....	10
1.4.1 - Regulação do metabolismo do glicogênio hepático de ratos no período de lactação.....	12
1.5 - Efeitos da desnutrição sobre:.....	13
1.5.1 - Pesos corporal, cerebelar, cerebral e hepático.....	13
1.5.2 - Metabolismo.....	15
1.5.2.1 - Metabolismo de Carboidratos	16
1.5.2.2 - Metabolismo de Lipídeos	17
1.5.2.3 - Concentração plasmática de alguns metabólitos	18
II – OBJETIVOS	20

III – RESULTADOS

ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO AO <i>CLINICAL NUTRITION</i> . Effects of protein undernutrition on hepatic, plasma and cerebelar parameters in 21 days-old rats.	21
IV – DISCUSSÃO.....	44
V - CONCLUSÕES.....	51
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
VII - ANEXOS.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Apo A-I: Apolipoproteína A-I

Apo B-I: Apolipoproteína B

CPT-I: Carnitina-palmitoil-transferase-I

DNA: Ácido desoxirribonucléico

HDL-c: Lipoproteína de alta densidade-colesterol

GL(+)-M: Desnutrição gestacional e lactacional com adição de metionina

GL(-)-M: Desnutrição gestacional e lactacional sem adição de metionina

IDL: Lipoproteína de densidade intermediária

IGF-I: Fator de crescimento semelhante à insulina

LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade-colesterol

PGGL: Desnutrição pré-gestacional, gestacional e lactacional

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

SNC: Sistema Nervoso Central

LISTA DE FIGURAS

Fig. I – Rotas metabólicas da metionina e homocisteína. (Troen <i>et al.</i> , 2003)	5
Fig. 1 - Effect of undernutrition on body weight at 1°, 7°, 14°, 21° days of life.....	38
Fig. 2 - Effect of undernutrition on brain weight in 21 days old rats.	38

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Percent (g/Kg diet) nutritional composition of the diets.....	39
Table 2. Effect of undernutrition on cerebellar weight, protein and DNA concentration in 21 days-old rats, fed with different diets.....	40
Table 3. Effect of undernutrition on liver weight, protein, DNA and glycogen concentration in 21 days-old rats, fed with different diets.....	40
Table 4. Effect of undernutrition on plasma glucose and serum albumin, in 21 days-old rats, fed with different diets.	41
Table 5. Effect of undernutrition on serum and liver lipids concentration of 21 days-old rats fed with different diets. Data are expressed as mean \pm SEM, n = 13.....	42

RESUMO

A desnutrição protéica provoca efeitos deletérios sobre o metabolismo, principalmente quando imposta em períodos de crescimento e desenvolvimento corporal, em decorrência de alterações bioquímicas e hormonais. Muitos estudos, utilizando modelos de desnutrição materna, sugerem uma série de adaptações bioquímicas nos filhotes, cujas repercussões na vida adulta podem tornar-se importantes fatores de risco para doenças como Diabetes mellitus tipo II, hipertensão e doença coronariana. Neste trabalho investigamos os efeitos da desnutrição protéica imposta nos períodos pré-gestacional - gestacional - lactacional, bem como nos períodos gestacional e lactacional sobre alguns parâmetros do metabolismo hepático, cerebelar e perfil lipídico plasmático de ratos Wistar de 21 dias de idade. Os animais desnutridos (dieta: 7% de caseína) foram divididos em três grupos: a) pré-gestacional, gestacional e lactacional (grupo denominado "PGGL"); b) gestacional e lactacional em cuja dieta foi adicionada metionina (denominado "GL(+)M"); c) gestacional e lactacional sem adição de metionina à dieta (denominado "GL(-)M") e d) grupo controle (dieta: 25 % caseína). Os pesos corporais dos filhotes foram verificados no 1º, 7º, 14º e 21º dias após o nascimento e o peso do fígado, cérebro e cerebelo apenas no 21º dia de vida pós-natal. Observamos que os ratos desnutridos apresentaram menor peso corporal após o primeiro dia do nascimento. Aos 21 dias os ratos do grupo PGGL e do grupo GL(+)M não apresentaram diferença de peso entre si, contudo apresentaram peso inferior ao do grupo controle. O grupo GL(-)M apresentou uma diminuição ponderal em todos os parâmetros avaliados. Hipoglicemia e hipoalbuminemia foram observadas em todos os grupos de ratos desnutridos. A concentração de DNA cerebelar de ratos do grupo GL(-)M foi superior à

observada em todos os outros grupos; no entanto, nestes animais a concentração cerebelar de proteínas foi inferior aos demais grupos experimentais. No fígado, a concentração de DNA dos grupos PGGL e GL(+)M não diferiu do controle, enquanto o grupo GL(-)M apresentou os menores valores. A concentração de proteínas hepáticas no grupo controle e no grupo GL(+)M foi semelhante, porém superior à observada nos grupos PGGL e GL(-)M. A concentração hepática de glicogênio foi superior nos ratos do grupo PGGL, sendo que nos dois outros grupos de animais desnutridos foi inferior ao controle, porém não se observou diferença entre eles. Todos os grupos desnutridos apresentaram maior concentração hepática de colesterol, sendo o maior valor encontrado no grupo GL(+)M. Os grupos PGGL e GL(+)M apresentaram os maiores valores de triglicerídeos hepáticos e o grupo GL(-)M, o menor valor. No plasma, a maior concentração de colesterol, HDL-c e LDL-c foi observada no grupo PGGL, enquanto que a concentração de triglicerídeos do grupo GL(-)M foi superior aos dois outros grupos de animais desnutridos e não diferiu do controle. Os resultados obtidos sugerem que os animais expostos à desnutrição protéica nos períodos de desenvolvimento podem, na vida adulta, apresentar fatores de risco para várias doenças crônico-degenerativas relacionadas com a Síndrome Metabólica.

ABSTRACT

The protein undernutrition has deleterious effects on the metabolism, especially when imposed through growth and development periods, due to biochemical, enzymatic and hormonal alterations. Many studies, using models of mother undernutrition, suggest a series of biochemical adaptations in the offspring, whose repercussions in the adult life can become important risk factors to diseases such as Diabetes mellitus type II, hypertension and coronary diseases. In the present study, we investigated the effects of the protein undernutrition imposed during the pre-gestational - gestational - lactational periods, as well as the gestational and lactational periods in some parameters of the liver, plasma, and cerebellum of Wistar rats with 21 days of age. The undernourished animals (diet: 7% of casein) were divided in three groups: a) pre-gestational, gestational and lactational, (group named "PGGL"); b) gestational and lactational with methionine added to the diet (named "GL(+)M"); c) gestational and lactational without the addition of methionine (named "GL(-)M") and d) control group (diet: 25 % casein). The body weight of the offspring was verified in the first, seventh, fourteenth and twenty-first days after birth and the weight of the liver, brain and cerebellum were checked only on the twenty-first day of life. We observed that the undernourished rats presented a lower body weight since the first day of life. After 21 days, the rats in the PGGL group and the GL(+)M group did not present any weight difference among them; however, they presented a lower weight compared to the control group. The GL(-)M group presented a considerable decrease in all evaluated parameters. Hypoglycemia and hypoalbuminemia were observed in all groups of undernourished rats. The DNA concentration of cerebellum rats' in the GL(-)M group was highest than that observed in all

other groups; on the other hand, the protein concentration of brain, in these animals, was lower than in the other experimental group. The liver concentration of DNA in the PGGL and GL(+)M groups did not differ from the control, while the GL(-)M group presented the lowest values. The liver protein concentration in the control group and in the GL(+)M was similar, but superior to the one observed in the PGGL and GL(-)M groups. The glycogen concentration in the liver was higher in rats from the group PGGL, whereas in the two other undernourished groups the concentration was lower than the control group, but no difference was observed between them. All undernourished groups presented a higher liver cholesterol concentration, being the highest value found in the GL(+)M group. The PGGL and GL(+)M groups presented the highest values of liver triglycerides and the undernourished group without methionine added to diet, the lowest value. In plasma, the highest cholesterol, HDL-c and LDL-c concentration was observed in PGGL group, while the triglyceride concentration in GL(-)M group was higher than the two other undernourished groups and did not differ from the control group. The results obtained suggest that animals submitted to protein undernutrition during development time can, in the adult live, present risk factors for various chronic degenerative diseases related with Metabolic Syndrome.

I – INTRODUÇÃO

1 - Aspectos gerais sobre a desnutrição

A desnutrição crônica é um dos principais problemas de saúde mundial e induz a prejuízos muitas vezes irreversíveis no desenvolvimento, sendo também uma das principais causas dos altos índices de mortalidade em diversos tipos de populações, especialmente em países em desenvolvimento (Etukudo *et al.*, 1999).

Os dois principais tipos de alterações que envolvem o desenvolvimento são: 1- patologias causadas por lesões ou agentes tóxicos (resultando em processos destrutivos, com rápido crescimento e diferenciação); 2- desordens causadas por nutrição inadequada, considerando que nutrientes em quantidades apropriadas são essenciais para a formação celular e organização tecidual (Morgane *et al.*, 2002).

A inadequação de nutrientes interfere nos programas básicos de desenvolvimento tecidual, por privar o órgão de ingredientes críticos, necessários para a estrutura e crescimento celular (citogênese e histogênese). As conseqüências da desnutrição dependem do tempo, período e intensidade do insulto nutricional (Morgane *et al.*, 2002).

Dentre as adaptações fisiológicas específicas do filhote submetido à desnutrição, como aumento da reciclagem de aminoácidos para síntese protéica, redução do catabolismo de aminoácidos, redução da síntese de uréia e da excreção de nitrogênio urinário (Torún e

Chew, 1994), está incluída a redução da taxa de crescimento. Essas adaptações têm papel determinante para a saúde e sobrevivência do recém-nascido, bem como para seu desenvolvimento (Barker, 1992; Huxley *et al.*, 2000).

Vários métodos são descritos na literatura para induzir a má nutrição durante o período gestacional e/ou lactacional: redução nos níveis protéicos da dieta oferecida às mães, diminuição na quantidade de dieta oferecida às mães, aumento no número de filhotes por ninhada, mamectomia parcial, exposição rotativa dos filhotes a fêmeas lactentes e não-lactentes, ou fêmeas lactentes e incubadora ou alimentação intragástrica dos filhotes. O modelo mais empregado utiliza uma redução da quantidade de proteínas na dieta das mães durante a gestação e/ou lactação, induzindo à desnutrição protéico-calórica nos filhotes (Mueller e Cox, 1946; Heywood *et al.*, 2004). Outro modelo é o da desnutrição pré-gestacional, gestacional e lactacional, que submete o filhote a uma forte e bem marcada desnutrição protéico-calórica crônica, com oferta de dieta com quantidade insuficiente de proteína nos principais períodos do desenvolvimento. Sykes e Cheyne (1976) observaram que a desnutrição pré e pós-natal é mais severa que a deficiência nutricional restrita a somente um dos períodos.

Os efeitos sobre o metabolismo, provocados por mudanças do estado nutricional e no balanço endócrino de um animal, ou seja, síntese e/ou liberação adequada de hormônios, podem ser estudados por meio de observações na concentração sanguínea de metabólitos (Harris, 1997). Filhotes, provenientes de mães alimentadas com dietas deficientes em proteína, nascem menores do que os que tiveram suas mães alimentadas com dieta normoprotéica. A desnutrição protéica materna provoca mudanças nos níveis de glicose, insulina, prolactina, progesterona, estradiol e leptina maternas, sendo que estas mudanças

podem influenciar na programação de eventuais doenças na vida adulta dos fetos em desenvolvimento (Fernandez-Twinn *et al.*, 2003). A desnutrição protéica imposta aos filhotes durante a gestação e lactação "programa" a função das células β -pancreáticas causando efeitos irreversíveis no mecanismo de homeostase da glicose, o que pode predispor estes animais ao desenvolvimento do diabetes na vida adulta (Heywood *et al.*, 2004).

1.1 - Desnutrição e SNC

O SNC é o tecido mais protegido dos danos provocados pela desnutrição (Morgane *et al.*, 1993). Mudanças histológicas têm sido observadas no SNC de várias espécies animais submetidos a dietas deficientes em proteínas. A severidade destas mudanças está relacionada com o período do desenvolvimento em que a restrição nutricional é imposta e com a duração da deficiência alimentar (Morgane *et al.*, 1993).

O crescimento de um órgão, incluindo o cérebro, ocorre por hiperplasia, hipertrofia, ou por ambos os fenômenos. Entretanto o cérebro não é um órgão homogêneo e o tempo de duração destas três fases difere nas várias regiões. Estas apresentam diferentes tipos celulares com características específicas de divisão e de possível migração para outros locais do sistema nervoso central (Winick, 1970). Portanto, o desenvolvimento maturacional do cérebro envolve uma série de fases que se sobrepõem temporariamente, em seqüência precisa, as quais são diferentes nas várias regiões cerebrais e dentro de uma região particular, além de variar entre as diferentes espécies animais (Morgane *et al.*, 2002). Desta forma, este importante conceito de "janela temporal", ou seja, os eventos no SNC ocorrendo num período específico e tempo determinado, sincronizado com outros eventos, é de extrema importância e pode ser alterado pela desnutrição, comprometendo o

desenvolvimento do SNC.

O período de rápido crescimento cerebral é um dos períodos críticos, contudo, o principal período é o correspondente à divisão de macroneurônios e células gliais (astrócitos, que ocorre por volta dos 2,5- 3 meses de gestação em humanos, e do 14^o-16^o dias de gestação em ratos), e segue-se o período da migração celular. Quando o insulto nutricional é induzido durante o período de rápido crescimento cerebral, pode provocar danos irreversíveis e significativos na vida adulta do animal (Rao *et al.*, 2003). A desnutrição protéica pré-gestacional e gestacional e/ou pós-natal causa alterações anatômicas, bioquímicas e fisiológicas no cérebro, assim como alterações comportamentais (Morgan 1992; Rotta *et al.*, 2003; Schweigert *et al.*, 2004). Estudos em humanos e em animais indicam que a combinação da má nutrição ou hiponutrição pré e pós-natal é mais deletéria que o insulto nutricional ocorrido durante um único período (Morgane *et al.*, 1993; Levitsky e Strupp, 1995, Morgane *et al.*, 2002). Entretanto, muitos estudos mostram que a má nutrição pré-natal resulta em maiores e mais permanentes deficiências que a má nutrição pós-natal (Smart, 1993). Isto mostra que a restrição alimentar quando aplicada prévia ou posteriormente ao “período crítico”, tem efeitos menos severos e temporários (Dobbing e Sands, 1971).

1.2 - Efeitos da metionina nos ratos em desenvolvimento

A metionina é um aminoácido essencial, necessário para o crescimento e desenvolvimento adequado de mamíferos. Além de ser necessária para a síntese protéica, é o principal doador de grupamentos metila, bem como participa na síntese da glutatona (Finkelstein, 1990). (Fig I.).

Finkelstein *et al.* (1988) citados por Dudásová e Grancicová (1992) mostraram a

possibilidade de que alguns fatores podem influenciar o metabolismo da metionina no fígado: fatores dietéticos, efeito de hormônios e atividade enzimática. Sendo a metionina um aminoácido essencial, deve ser adicionada às dietas protéicas incapazes de fornecer as necessidades básicas desse aminoácido, como as dietas utilizadas neste trabalho, que têm como fonte protéica a caseína. A síntese protéica adequada necessita tanto de metionina, quanto de cisteína, sendo a metionina o aminoácido iniciador desta síntese.

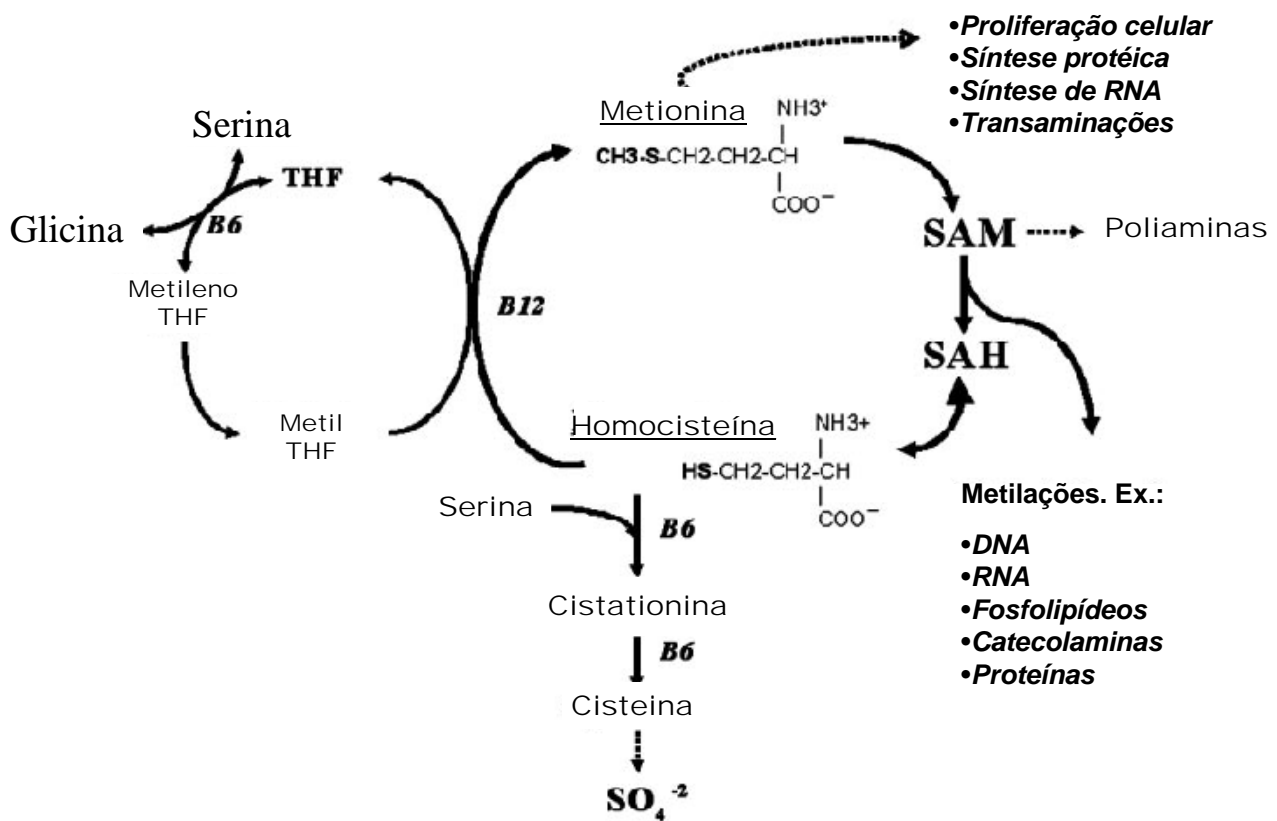


Fig. I – Rotas metabólicas da metionina e homocisteína. (Troen *et al.*, 2003)

A suplementação de dietas com metionina causa um aumento no peso corporal de ratos e alguns resultados indicam que este aminoácido também tem um papel importante no metabolismo lipídico. Troen *et al.* (2003), demonstraram que a suplementação dietética de ambas, metionina e homocisteína, podem acelerar processos de deficiência de Apo-E em ratos e causar lesões vasculares pré-determinando o surgimento de placas de ateroma. Além disso, está estabelecido que a homocisteína é considerada fator de risco independente para a ocorrência de doença vascular (Clarke *et al.*, 1991).

Estudos mostraram que ratos submetidos à dieta hipoprotéica (soja como fonte de proteínas) apresentaram um aumento na concentração hepática de triglicerídeos quando a dieta foi suplementada com metionina em concentração igual ou superior a 0,5% (Azevedo *et al.*, 1994; Schweigert, 1998). Leclerc *et al.* (1988) em estudos com ratas no período de lactação, relataram que o aumento do conteúdo de metionina da dieta (contendo 12% de caseína) determina um maior consumo de alimento e uma menor perda de peso das mães, ocasionando um maior crescimento nos filhotes.

A regulação metabólica pode ser inadequada caso não sejam alcançados níveis suficientes de metionina ou de seus metabólitos ou, por outro lado, o organismo precisa ser protegido do aumento de vários intermediários dessa rota, como no caso geração da homocisteína, pois apesar de ser um aminoácido essencial, é também o mais tóxico dentre os aminoácidos nutricionalmente importantes, quando sua concentração na dieta é muito alta (Hardwick *et al.*, 1970; Finkelstein *et al.*, 1982). A alta ingestão de metionina promove retardo no crescimento, mudanças histo-patológicas no fígado, rim e baço além de produzir mudanças ateroscleróticas em ratos, coelhos e porcos (Troen *et al.* 2003).

Segundo Reeves *et al.* (1993), a caseína fornece menos da metade da cisteína requerida pelas ratas durante a gestação. Para que isto seja compensado, metionina é adicionada às dietas para que as ratas possam produzir cisteína pela transulfuração da homocisteína (Fig.I).

Estudos com ratas grávidas mostraram que o crescimento fetal é mais sensível às deficiências dos aminoácidos metionina, valina e isoleucina (Rees *et al.*, 2000). Uma grande variedade de reações celulares de metilação, que incluem mudanças na metilação do DNA, e que podem definir processos de crescimento dos órgãos assim como o crescimento corporal, são dependentes da disponibilidade celular de S-adenosil metionina e S-adenosil homocisteína (Rees *et al.*, 2000).

O metabolismo da homocisteína materna pode influenciar os níveis de metilação de DNA no feto, sendo que nestes existe a falta da enzima cistationina β sintase, e o único meio de reduzir a concentração de homocisteína é através da síntese de S-adenosil homocisteína, a qual é remetilada a SAM (Rees *et al.*, 2000).

Em ratos adultos, o conteúdo de DNA metilado depende da composição da dieta, e pode ser induzido por mudanças no status de homocisteína e folato da dieta. Rees *et al.* (2000); sugerem que mudanças no metabolismo da metionina, causadas por glicocorticóides, que atravessam a placenta, ou pela interação com outros aminoácidos como a treonina, aumentam a produção de homocisteína, o que leva a um aumento da metilação endógena de DNA hepático nos fetos de ratas desnutridas.

Em humanos, os níveis elevados de homocisteína estão associados a complicações obstétricas incluindo pré-eclampsia e defeitos no tubo neural (Wouters *et al.*, 1993). A remetilação de S-adenosil homocisteína aumenta a demanda de grupos metilas derivados do

tetrahidrofolato, reduzindo a disponibilidade de folatos para a síntese de deoxinucleosídeos-trifosfato (Rees *et al.*, 2000).

Um aumento da homocisteína materna pode comprometer o desenvolvimento fetal e causar intolerância à glicose e hipertensão na vida adulta (Rees *et al.*, 2000). Experimentos com culturas de células sugerem que a programação fetal do metabolismo adulto não é uma simples consequência das alterações do crescimento celular. Células isoladas mostram mudanças permanentes nas suas funções, por exemplo: ilhotas pancreáticas de filhotes de animais protéico-desnutridos liberam menos insulina (Cherif *et al.* 1996).

1.3 - Cerebelo

O córtex cerebelar do rato adulto apresenta três camadas: a camada molecular (externa), as células de Purkinje (ganglionar ou intermediária) e a camada granular (interna), e contém seis tipos neuronais (Ramón y Cajal, 1911; Clark *et al.*, 1993), sendo que o tipo neuronal principal é de células de Purkinje. Outros quatro tipos de células são interneurônios do córtex: células de Golgi (1), células granulares (2) (localizadas na camada granular), células em cesto (3) e células estelares (4) (localizadas na camada molecular) sendo que o sexto tipo de células neuronais, as células de Lugaro são mais raras. Existem ainda no córtex cerebelar os axônios das fibras musgosas, que fazem sinapse com as células granulares e as fibras trepadoras que se ramificam na camada molecular. As células granulares são do tipo mais abundante no cerebelo de rato normal adulto: do total de 80% de células neuronais, 85% destas são células granulares. As células gliais do cerebelo de rato adulto consistem de oligodendrócitos, abundantes na substância branca e também presentes nas camadas granulares e de células de Purkinje, e de astrócitos numa proporção de seis

células (quatro oligodendrócitos e dois astrócitos) para cada célula de Purkinje (Clark *et al.* 1993).

O crescimento celular deriva da proliferação pós-natal de células existentes na camada proliferativa externa (Altman e Sudarshan, 1970). Esta camada persiste no rato até o vigésimo primeiro dia pós-natal. A camada proliferativa externa consiste de duas zonas: a zona superficial proliferativa e a zona pré-migratória básica. As células granulares imaturas migram desta camada proliferativa externa, onde ocorre a divisão celular, através da camada molecular até à camada granular. Este processo de proliferação e migração das células granulares ocorre durante as três primeiras semanas pós-natal, em cerebelo de ratos (Atman e Sudarshan, 1970).

Uma característica do desenvolvimento cerebelar é o fato de neurogênese e gliogênese ocorrerem simultaneamente (Greenwood e Craig, 1987). Tanto a proliferação, quanto o crescimento celular máximo, ocorrem desde o nascimento até o vigésimo primeiro dia de vida pós-natal (Cremer *et al.*, 1982). O cerebelo de rato normonutrido recém-nascido contém somente 3% do DNA de um cerebelo de rato adulto normal (Balazs, 1971).

O cerebelo é um importante centro regulador de controle da atividade motora, tanto no aspecto quantitativo quanto qualitativo do desempenho motor. Além disso, o cerebelo utiliza toda uma escala de informação sensorial (tátil, auditiva e visual) para constantemente orientar a ação motora, a fim de encontrar a força necessária, direção, velocidade de contração e relaxamento muscular (Johanson *et al.*, 1980).

A desnutrição pode afetar diferentes processos de desenvolvimento do SNC: multiplicação celular, migração celular, diferenciação e maturação (Duran *et al.*, 2005). Os resultados da desnutrição sobre o crescimento celular podem ser de longa duração, como

nos casos de diminuição no número de oligodendrócitos e alterações nos dendritos das células de Purkinje (Vitiello *et al.*, 1985).

O cerebelo de rato presta-se bem ao estudo dos efeitos da desnutrição devido à sua composição celular simples e sua morfologia bem conhecida. A ontogenia cerebelar nos roedores é caracterizada pela rápida proliferação celular pós-natal e pela composição celular mais homogênea do que outras regiões do SNC favorecendo, do ponto de vista bioquímico, a melhor correlação das alterações com processos morfológicos (Vitiello *et al.*, 1985).

A desnutrição provoca redução no peso e alterações na concentração cerebelar de DNA. Souza *et al.* (2004) observaram que aos 21 dias de idade ratos desnutridos apresentaram maior concentração cerebelar de DNA, contudo também observaram um atraso na divisão celular, em comparação com o grupo normonutrido. Fish e Winick (1969) detectaram um aumento da concentração cerebelar de DNA em ratos desnutridos de 21 dias de idade, em relação a animais que receberam dieta com quantidade adequada de proteínas.

Zamanhof *et al.* (1968) encontraram uma redução da divisão celular em todos os órgãos fetais de animais desnutridos (quando comparado a animais normonutridos), incluindo o cérebro. A desnutrição perinatal provoca um retardo na divisão celular com um prolongamento do tempo de ciclo celular total (Souza *et al.*, 2004).

1.4 - Fígado

O fígado exerce um papel fundamental na homeostasia dos nutrientes energéticos. Neste órgão o glicogênio é armazenado em resposta ao excesso de nutrientes na fase absorptiva, estimulado pelo aumento da glicose sanguínea e quantidade de insulina; a

glicogenólise ocorre na presença de hormônios regulatórios, com vistas à manutenção da glicemia. Também, o fígado produz glicose, pelo processo de gliconeogênese, para ser metabolizada nos tecidos que dela dependem (SNC, eritrócitos e medula renal). Por outro lado, é o principal órgão capaz de produzir substratos alternativos à glicose, pelo processo de cetogênese. Devido ao intenso catabolismo de aminoácidos, o fígado contribui para o equilíbrio estacionário dos aminoácidos circulantes, além de ter papel fundamental na eliminação do amônio, que é transformado em uréia, contribuindo assim, de forma indireta, para a manutenção do pH (Marks *et al.*, 1997).

Este órgão é fundamental no metabolismo lipídico: quando a razão insulina/glucagon estiver aumentada converte acetil-CoA em ácidos graxos, quando a razão insulina/glucagon estiver diminuída converte o excesso de ácidos graxos em corpos cetônicos; é o principal órgão receptor de IDL, de LDL e de remanescentes de quilomicra, e também é o local de síntese de VLDL e de HDL. É o órgão responsável pela homeostasia do metabolismo do colesterol (Voet & Voet , 2000). O fígado é o principal órgão de síntese e degradação de proteínas plasmáticas e de inativação de xenobióticos por biotransformação, atuando como barreira bioquímica diante de produtos tóxicos (Gumucio e Miller, 1982).

Em ratos, a desnutrição protéica imposta nos períodos críticos de desenvolvimento causa mudanças mitocondriais no fígado e músculo esquelético, os principais sítios de ação da insulina. As atividades e a expressão gênica de enzimas hepáticas sensíveis á insulina estão alteradas, como no caso da glicoquinase que tem sua atividade reduzida e a fosfoenolpiruvatocarboxiquinase aumentada (Park K.S. *et al.*, 2003).

A desnutrição protéica *in útero* também causa mudanças no conteúdo de DNA mitocondrial pancreático, prejudicando o desenvolvimento das células- β , conseqüentemente

diminuindo a secreção de insulina em resposta à glicose e causando distúrbios no metabolismo das células hepáticas. Estes fatos podem contribuir para o aparecimento de Diabetes *mellitus* tipo II e resistência à insulina na vida adulta destes animais (Park *et al.*, 2004).

1.4.1 - Regulação do metabolismo do glicogênio hepático de ratos no período de lactação

A concentração de glicogênio hepático, bem como de insulina plasmática são baixas nos primeiros dez dias de vida pós-natal. A combinação de reduzida utilização periférica de glicose e um efeito inibitório na liberação de insulina, mediante uma dieta com alto conteúdo lipídico, provavelmente limita o acúmulo de glicogênio hepático e muscular. Neste período, a glicose é especialmente derivada de gliconeogênese a partir de aminoácidos e glicerol. Em torno do 14º dia, a atividade da glicoquinase hepática aumenta, e do 14º ao 21º dias de vida pós-natal há um aumento acentuado da síntese de glicogênio hepático. Provavelmente este fato esteja relacionado com o período de transição alimentar entre uma dieta com alto teor lipídico para uma dieta com alto teor de carboidratos. Entre o 7º e o 21º dias de vida pós-natal, o aumento da atividade da glicoquinase hepática determinaria um aumento na concentração de glicose-6-fosfato e isso possibilitaria uma ativação alostérica da enzima glicogênio sintase, com diminuição concomitantemente da atividade da glicogênio fosforilase. Sendo assim, o aumento na síntese de glicogênio hepático neste período seria devido à uma ativação alostérica da glicogênio sintase pela proteína fosfatase-1 hepática (Margolis e Curnow, 1980).

Estudos de Azzolin *et al.* (1996) mostraram que há um aumento na concentração

hepática de glicogênio de ratos desnutridos de 7 dias de idade pós-natal, quando comparado ao grupo controle, sem alteração na mobilização de glicogênio. Esses dados sugerem que nesta idade os ratos desnutridos apresentam uma maior sensibilidade à insulina.

1.5 - Efeitos da desnutrição sobre:

1.5.1 - Pesos corporal, cerebelar, cerebral e hepático

Desai *et al.* (1996), Burdige *et al.* (2003) e Vonnahme *et al.* (2003) mostraram que a desnutrição antes da concepção pode influenciar o crescimento e a composição de órgãos vitais como rins, pulmões, fígado, cérebro e coração. A restrição protéica durante os períodos críticos do desenvolvimento dos filhotes pode provocar redução do tamanho de órgãos e tecidos, bem como alterar a atividade de algumas enzimas (Desai *et al.*, 1996). A deficiência protéica na alimentação materna pode alterar as atividades das enzimas do intestino, assim como enzimas hidrolíticas dos órgãos digestivos dos filhotes, resultando em desordens metabólicas e permitindo o aparecimento de fatores de risco para doenças na vida adulta (Timofeeva *et al.*, 2002).

Diversos autores mostram que existe relação entre o estado nutricional da mãe e os pesos dos filhotes ao nascimento (Woodall *et al.*, 1999; Mehta *et al.*, 2002). Quando os estoques de proteína materna são baixos e a dieta é composta principalmente por carboidratos, como no caso da desnutrição pré-gestacional utilizando 7% de caseína, a fonte protéica, essencial para o crescimento dos tecidos fetais, é proveniente do catabolismo muscular visceral da mãe, que pode não ser suficiente para evitar o baixo peso ao nascimento (Frazer e Huggett, 1970). A diminuição na quantidade de leite é decorrente da desnutrição no período de lactação; caso haja também uma desnutrição gestacional, a

diminuição na produção de leite será ainda maior e refletirá em prejuízo no crescimento e no desenvolvimento adequado dos filhotes em amamentação (Mueller e Cox, 1946; Desai *et al.*, 1996).

Alguns dados indicam que a exposição à desnutrição tem maior impacto no cérebro quando o insulto nutricional ocorre durante a vida pós-natal (Miller e Resnick, 1980), sendo que, a desnutrição pré-gestacional oferece maior prejuízo em relação a todo o SNC. A desnutrição pós-natal diminui o peso cerebral em maior proporção, do que a desnutrição pré-natal, porque a desnutrição pós-natal ocorre numa fase onde o crescimento cerebral é elevado. Muitos trabalhos mostraram que a redução de peso do cérebro é menor do que a redução do peso corporal (Alleyne *et al.*, 1977; Bennis-Taleb *et al.*, 1999). Esta relativa conservação pode induzir à idéia errônea de que a desnutrição não afeta o tecido cerebral, contudo, alguns estudos mostraram que o decréscimo de DNA, diminuído número de células gliais e insuficiente conteúdo de mielina foram encontrados em crianças com desnutrição marasmática bem como em modelos animais (Birch, 1971; Dobbing e Smart, 1974). O crescimento cerebelar ocorre principalmente na vida pós-natal e por isso é menos suscetível aos efeitos da desnutrição pré-natal e mais vulnerável aos efeitos da desnutrição pós-natal (Balazs e Patel, 1973).

Vários efeitos do déficit protéico são observados nos órgãos de ratos provenientes de mães desnutridas e/ou expostas à desnutrição durante a lactação, sendo que algumas alterações permanecem na vida adulta. Estudos com ratos de 94 dias de idade mostraram que o peso relativo do fígado, em relação ao peso corporal, foi menor no grupo com restrição protéica. Porém, o peso relativo de lipídios (massa gorda/peso corporal) foi maior, o que pode sugerir alteração da composição hepática em ratos desnutridos (Rao *et al.*, 2003).

1.5.2 - Metabolismo

As reações ao déficit nutricional protéico incluem a remoção de aminoácidos essenciais dos tecidos para que o fígado possa manter a homeostase, sendo que a quantidade de albumina sintetizada pelo fígado de ratos desnutridos é significativamente menor do que a dos alimentados com dieta normal (Kirsch *et al.*, 1968; Tovar *et al.*, 1998).

O crescimento fetal é um processo complexo controlado por interações específicas entre nutrientes, hormônios e fatores de crescimento. IGFs (Fator de crescimento semelhante à insulina) e suas proteínas ligantes têm um importante papel no crescimento e desenvolvimento fetal. As IGFs (I e II) são estruturalmente similares à pró-insulina e são chaves mitogênicas que afetam o crescimento e o metabolismo celular, agindo como fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. No estudo de Muaku *et al.* (1995), uma dieta com 5% de proteína, oferecida às mães durante a gestação, diminuiu os níveis plasmáticos de IGF-I nos filhotes, fato que está relacionado com o prejuízo no crescimento corporal destes animais. IGF-I é um dos peptídeos mais afetados pela desnutrição materna, sendo que a concentração de insulina e glicocorticóides, podem contribuir para as alterações nos IGFs e suas proteínas de ligação, causando implicações como a diminuição da capacidade proliferativa dos hepatócitos em ratos desnutridos (El Khattabi *et al.*, 2003).

O desenvolvimento dos vasos sanguíneos durante a vida fetal pode ser afetado por alterações hormonais induzidas por dietas pobres em proteína. A restrição protéica pode também causar redução da atividade da enzima placentária 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase (Langley-Evans, 1994), permitindo um aumento na passagem placentária de glicocorticóides para o feto. Glicocorticóides podem ter um papel importante na redução da vascularização de órgãos como o cérebro, pâncreas e coração, pois são potentes inibidores

da angiogênese (Crum *et al.*, 1985), diminuindo assim a disponibilidade de nutrientes, como os aminoácidos (Gorman *et al.*, 1996).

1. 5.2.1 - Metabolismo de Carboidratos

No período de gestação, o feto é continuamente alimentado, através da placenta, com uma dieta rica em carboidratos e aminoácidos, e pobre em lipídeos. Nas cobaias, a placenta é permeável aos ácidos graxos livres, os quais são armazenados no fígado e tecido adiposo, sendo que muito pouco é oxidado pelo tecido fetal (Girard e Ferré, 1982). Após o nascimento o recém-nascido passa por um breve período de jejum até que se estabeleça a amamentação. Do ponto de vista energético, o leite é uma dieta rica em lipídeos e baixa em carboidratos. A lactose é o carboidrato predominante no leite e corresponde, em ratos, a um conteúdo de 3 % (Jenness, 1974). No período de amamentação, em ratos, a gliconeogênese é a rota predominante para a produção hepática de glicose, uma vez que é pequena a concentração de glicogênio no fígado (Girard, 1986).

Em ratos submetidos à desnutrição protéica, Heard (1978) observou distúrbios da homeostase da glicose, refletidos numa diminuição da glicemia e no aumento da concentração de glicogênio hepático. Ratos submetidos à desnutrição protéico-calórica crônica sofrem prejuízos na secreção da insulina, contudo têm poucas alterações na tolerância à glicose, provavelmente devido à alta sensibilidade à insulina (Okitolonda *et al.*, 1987). A insulina aumenta a tolerância a carboidratos, aumentando a sua utilização e armazenamento no fígado e músculo, na forma de glicogênio (Okitolonda *et al.*, 1987).

1.5.2.2 - Metabolismo de Lipídeos

A utilização de corpos cetônicos pelo SNC, no período de lactação, é em torno de 10 vezes superior à utilização na idade adulta. Este aumento é devido a maior atividade das enzimas de utilização de corpos cetônicos, bem como ao aumento de seus transportadores no endotélio capilar da barreira hematoencefálica. Guzmán *et al.* (1992) mostraram que no período lactacional os ratos provenientes de mães alimentadas com dietas pobres em proteínas tiveram uma produção de corpos cetônicos ainda maior, para que o cérebro fosse protegido dos efeitos produzidos pela restrição protéica. Além disto, estes autores mostraram que ratos provenientes de mães que foram desnutridas 5 semanas antes da gestação, durante a gestação e a lactação, ou somente no período gestacional e lactacional, apresentaram uma maior atividade da CPT-1 (carnitina-palmitoil-transferase I), bem como uma menor sensibilidade ao malonil-CoA durante todo o período de lactação, em relação aos ratos normonutridos de mesma idade. Esses dados sugerem que mudanças adaptativas nas propriedades cinéticas e regulatórias da CPT-1 podem ter um papel fundamental na estimulação da cetogênese hepática induzida nos ratos cujas mães tiveram dietas com déficit protéico (Gúzman *et al.*, 1992).

Joshi *et al.* (2003) observaram que o peso do fígado de animais desnutridos era menor do que o encontrado no grupo controle, no entanto, o peso relativo de lipídeos do fígado de animais alimentados com dietas de restrição protéica foi maior do que o observado em animais do grupo controle. Esses dados sugerem que existem alterações na composição do fígado desses ratos. Esta observação assume importância visto que em humanos, a restrição protéica resulta no “fígado gordo”, como o descrito em crianças com desnutrição do tipo kwashiorkor. Os mesmos pesquisadores mostraram que filhotes de ratas submetidas à

desnutrição protéica têm altos níveis de colesterol hepático, que continuam elevados até 180 dias de idade.

O baixo peso ao nascer propicia o aparecimento de fatores de risco para a aterosclerose, dislipidemias e pressão arterial alta na vida adulta. Além disso, está fortemente relacionado com a malnutrição intrauterina responsável por alguns defeitos morfológicos e metabólicos (Szitanyi *et al.*, 2000).

1.5.2.3 - Concentração plasmática de alguns metabólitos

Os efeitos sobre o metabolismo, provocados por mudanças no estado nutricional, podem ser estudados mediante a observação de alterações na concentração sangüínea de metabólitos. Flutuações na concentração sangüínea de glicose, ácidos graxos e aminoácidos, devido às alterações na ingestão dos mesmos, podem alterar a velocidade de secreção de hormônios e influenciar rotas metabólicas (Azzolin, 1999).

A manutenção de níveis estáveis de glicemia é um dos mecanismos homeostáticos melhor regulado, no qual o fígado, tecidos extra-hepáticos e alguns hormônios como a insulina, hormônio do crescimento, ACTH, glicocorticóides, epinefrina e glucagon têm um papel muito importante. A insulina é o principal hormônio responsável pela homeostasia da glicose e, para que este efeito seja exercido, a participação de tecidos como o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo são importantes. A deficiência da insulina para a estimulação da captação de glicose pelo músculo e inibição da produção hepática de glicose faz parte da patogenicidade da *Diabetes mellitus* tipo II, sendo que a alteração no tecido adiposo é um dos principais determinantes para o surgimento da doença. Na *Diabetes*

mellitus tipo II, além da deterioração das células β do pâncreas, há um concomitante acúmulo de lipídeos no tecido muscular. A hiperglicemia característica da doença resulta num aumento dos níveis de ácidos graxos livres e VLDL causando um maior acúmulo de gordura no músculo com um potencial lipotóxico associado com a diminuída sensibilidade à insulina (McGarry, 2002).

A homeostase do colesterol é mantida pelo balanço da sua absorção intestinal e síntese endógena, secreção biliar de colesterol e de sais biliares (Shepherd, 2001). O principal mecanismo conhecido sobre a homeostase do colesterol é o controle de sua biossíntese, que ocorre no retículo endoplasmático (Simons e Ikonen, 2000). Pesquisas mostraram que o metabolismo do colesterol fetal não é autônomo, mas responde às mudanças no metabolismo materno do colesterol (Hrab *et al.*, 1994).

Uma combinação de hipoinsulinemia, hipoglicemia, aumento dos ácidos graxos livres e aminoácidos estimulam a gliconeogênese hepática, rota predominante para produção hepática de glicose em ratos no período de amamentação (Girard, 1986). Em contrapartida, a concentração plasmática especificamente do β -hidroxibutirato é menor em filhotes de ratas alimentadas com 8% de proteína durante a gestação e lactação, tanto em jejum quanto no estado alimentado. Porém, a concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados destes animais é maior no estado alimentado, sugerindo que a dieta materna pobre em proteínas pode afetar o metabolismo dos corpos cetônicos nos filhotes (Ozanne *et al.*, 1998).

Na desnutrição materna, os corpos cetônicos produzidos pela mãe atravessam a placenta para serem também utilizados pelos fetos, para economizar glicose. Assim este açúcar fica disponível para as reações biossintéticas de aminoácidos não essenciais, inibindo a oxidação dos cetoácidos de cadeia ramificada (Shambaugh, 1985).

II – OBJETIVOS

II.1 - Objetivo Geral

Analisar os efeitos de diferentes modelos de desnutrição protéica (i) pré-gestacional, gestacional e lactacional, e (ii) gestacional e lactacional suplementados ou não com metionina, sobre parâmetros hepáticos, séricos e cerebelares de ratos de 21 dias de idade.

II.2 - Objetivos Específicos

Verificar o efeito de diferentes tipos de desnutrição em ratos de 21 dias de idade, sobre os seguintes itens:

- Parâmetros hepáticos: massa, concentração de lipídeos (colesterol e triglicerídeos), concentração protéica, de glicogênio e de DNA.
- Parâmetros cerebelares: massa, concentração protéica e de DNA.
- Parâmetros séricos: concentração plasmática de glicose, albumina e lipídeos (colesterol total, triglicerídeos, c-HDL, c-LDL)
- Parâmetros corporais: massa corporal e cerebral.

III – RESULTADOS

ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO AO *CLINICAL NUTRITION*

Effects of protein undernutrition on hepatic, plasma and cerebellar parameters in 21 days-old rats.

Ana Claudia Moreira Bortolini¹, Liane N. Rotta^{1,2}, Kally Janaina Berleze¹, Leticia Schmidt¹, Fabiane da Costa¹ and Marcos L. S. Perry^{1,3}.

¹Departamento de Bioquímica, ICBS, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Curso de Biomedicina e Curso de Farmácia, Universidade Luterana do Brasil, Canoas/RS.

³Corresponding author:

Marcos Luiz Santos Perry

Rua Ramiro Barcelos 2600 - anexo

CEP: 90035-000 - Porto Alegre/RS - Brasil

Telephone: +55 51 3316 5560

e-mail: mlsperry@excite.com

Short title: Undernutrition alters biochemical parameters in young rats.

ABSTRACT

The protein undernutrition alters the adequate development inducing important alterations, depending on period, time and grade of nutritional insult. We investigated the protein undernutrition (diet: 8% casein – control group: 25% casein) imposed in pregestational, gestational and lactational periods [PGGL group] or only gestational and lactational, which diets were supplemented [GL(+)]M or not with methionine [GL(-)]M, on biochemical parameters of liver, plasma and cerebellum from 21 days-old rats. The undernourished rats presented lower corporal weight since the first postnatal day and the GL(-)]M showed a remarkable decrease in hepatic, cerebral and cerebelar weight. Low glucose and albumin levels were observed in serum from undernourished rats. The cerebellum of GL(-)]M rats had the highest DNA concentration and in liver this parameter was the lowest when compared to the other groups. The hepatic glycogen concentration was higher in PGGL group and all undernourished groups showed higher cholesterol level compared to control. In serum, GL(-)]M rats showed an important increase in cholesterol concentration and HDL-C and LDL-C was higher than the other undernourished groups. The PGGL and GL(-)]M groups showed increased hepatic triglyceride concentration and decreased in serum, while the GL(+)]M rats showed an important reduction in liver triglyceride concentration. The metabolic changes induced by perinatal protein undernutrition may contribute to the development of disorders related to metabolic syndrome in adult life.

Keywords: undernutrition, liver, cerebellum, serum, rats and methionine.

INTRODUCTION

The deleterious effects of protein undernutrition (that remains as a common world health problem) on the postnatal growth and development of infants have been known for a long time [1-2]. Environmental factors in early life have been described as of substantial importance to disease risk in later years [3-4]. Epidemiological studies have raised the possibility that “early lifestyle” factors, which are not determined by the individual but by the intra-uterine or neonatal environment, are critically important [5]. These factors may produce adaptations that permanently alter the adult metabolism and responses in a direction to optimize survival under conditions of malnutrition, stress or other deprivation [6].

Undernutrition triggers a number of biochemical, enzymatic and hormonal adaptations including an increase in the recycling of amino acids for protein synthesis and a decrease in amino acid catabolism [7]. Animal studies have shown that the timing, duration and exact nature of the insult during pregnancy are also important determinants of the pattern of fetal growth and of the specific postnatal outcomes [4]. Events in fetal and early postnatal growth period are considered critical to determine permanent metabolic alterations through adult life [8]. Nutritional state in early life has been correlated to the susceptibility to chronic diseases in adulthood, including non-insulin-dependent diabetes mellitus, cardiovascular disease and hypertension. Alterations in glucose tolerance, impairment in insulin secretion and insulin resistance have been detected in adult progeny of protein malnourished dams [4-5]. In addition, in studies it was observed that protein malnutrition alters oxidation to CO₂,

conversion to lipids and protein synthesis from [U-¹⁴C]glycine in cerebellum of undernourished rats at 7 and 21 days of postnatal life, indicating a retardation in the normally ordered progression of brain development [9].

Protein depletion causes depressed weight gain and can exert a similar influence on growth, size and composition of vital organs and tissues [10-11]. Poor fetal nutrition and chronic malnutrition are accompanied by organ-selective changes in nutrient distribution, such as the growth of some organs. The brain is relatively protected while other organs as the viscera suffers more [10-12]. With regard to CNS, malnutrition affects different developmental processes: cell multiplication, cell migration and/or differentiation and maturation. The first 3 weeks of postnatal life represent the period of brain growth spurt, when intensive neurogenesis, proliferation of glial cells and myelination occurs. The cerebellum growth occurs mainly postnatally and therefore is more susceptible to prenatal malnutrition [13]. Chemical events can be more easily correlated with morphological processes in cerebellum than in other CNS regions because cerebellum is much more homogeneous in cellular composition than the other brain regions [14].

Methionine (Met) is the amino acid limiting of casein, and diets without addition of L-methionine trigger severe effects in some aspects of development. A lack of Met can affect protein synthesis and S-adenosylmethionine formation, which are essential for the synthesis of glutathione and compounds that contain methyl groups [9].

The liver is an organ center of intermediary metabolism. It acts as the glucose reservoir of the body and plays a central role in nitrogen and protein metabolism. Besides, liver plays a role in processing of the lipids substrates in the lipoproteins metabolism [15-16]. Relatively few studies have observed the effects of undernutrition on the liver metabolism homeostasis

during the period of early life.

In this report we goal to determine the effect of protein restriction in diets supplemented or not L-methionine in early periods of the development (pregestational, gestational and lactational or gestational and lactational) on body weight and on some parameters of lipid and carbohydrate metabolism in liver (cholesterol, triglyceride, glycogen, protein and DNA concentration), on cerebellar parameters (protein and DNA concentration) and on serum lipids.

METHODS AND MATERIALS

a) Chemicals: Chloroform was purchased from Synth (Diadema/SP), glycogen from Sigma Chemical Co (St Louis, MO, U.S.A.) and methanol from Nuclear (Diadema/SP). All Other chemicals used were obtained from Merck S.A., Porto Alegre, Brazil.

b) Animals: Albino Wistar rats were obtained from UFRGS Biochemistry Department. Pregestational, gestational and lactational undernutrition, or just gestational and lactational undernutritions were induced by restricting to 7% the protein content of the mothers' diet (control group: 25% protein). The litter size was adjusted to eight pups per mother on the first postpartum day and they were maintained at 22°C on a 12h light/12h dark cycle until experimental age (21-day-old). The protocol concerning this research was used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, School of Veterinary medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Brazil.

c) Diets: The animals had free access to water and isocaloric diets (table 1), containing 25% or 7% of protein (casein). Salt and vitamins as recommended by the Association of Official

Analytical Chemists and previously described by our group [9]. Pregestational, gestational and lactational undernutrition (PGGL), or just gestational and lactational undernutrition (GL) were induced by restricting to 7% the protein content of the mothers' diet. Experimental groups: (1) PGGL: the female rats received the diet containing 7% casein with methionine addition, five weeks before mate and the same diet was maintained during the entire gestation and lactational periods; (2) GL(+)M: rats received the diet with 7% of casein (supplemented with methionine) only during gestational and lactational periods; (3) GL(-)M: rats received the diet with 7% of casein (without methionine supplementation) only during gestational and lactational periods; (4) Control (C) group: received a diet containing 25% of casein during all periods.

d) Tissue obtainment and analysis: The experimental rats were killed by decapitation; the cerebral structure was removed and weighed. The cerebellum and the liver were removed, weighed and homogenized at NaCl 0.9% in dilutions 1:10 (w:v) and 1:5 (w:v), respectively. We measured levels of glycogen, triacylglycerols and cholesterol. Hepatic glycogen was measured by the Krisman method [17]. Liver lipids were extracted by the method of Folch et al.,[18]. Liver cholesterol was determined by the method of Bergmeyer [19], hepatic triglycerides by Soloni method [20], protein by Lowry method [21] and the DNA by the method of Burton [22].

e) Blood analysis: The blood was obtained and immediately centrifuged at 1000xg for 10 min. Aliquots of serum were removed to determination of serum lipids (cholesterol, HDL, LDL e triglycerides) and albumin. The plasma glucose determination was measured in plasma fluoreted (GLUC-DH 1.07116-0001); Biochemical analysis was performed in a Multi-test Analyzer (Mega, Merck, Darmstadt, Germany, bromocresol method.) by using specific kits

supplied by Merck, as follows: albumin (SMT, 1.19722.0001), triglycerides (SMT-triglycerides, 1.19706.0001, GPO-PAP method); cholesterol (cholesterol-SMT. 1.19738.0001, CHOD-PAP method); and LDL cholesterol (1.14992.0001, CHOD-PAP method). HDL cholesterol was determined using a kit (HDL cholesterol direct FS) from DiaSys (Diagnostic Systems International, Holzheim, Germany).

g) *Statistical analysis*: data were analyzed by ANOVA followed by Duncan's multiple range test when values were significant, with the significance level set at $p < 0.05$. All analyses were done using SPSS program, version 10 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

We studied the effect of malnutrition on brain and body weight. Figures 1 and 2 show that these parameters were decreased in all undernourished groups and the group GL(-)M shows the lowest brain and body weight. It was observed a reduction in the body weight of undernourished rats since the first postnatal day, reaching only approximately one third of the body weight of control rats, at 21 postnatal days.

All malnourished groups presented lower cerebellar weight than the control group and GL(-)M undernourished animals were more severely affected: the cerebellum weight was only 56% of the control group (Table II). In this structure, the protein concentration was decreased only in GL(-)M, and DNA concentration presented an accent increase in the same undernourished group (Table II).

The serum from the undernourished groups had lower glucose and albumin concentration (Table IV).

We studied the effect of undernutrition on some hepatic parameters. The liver weight of undernourished groups was importantly reduced, with the GL(-)M group presenting only about 17% of liver weight from the control group and a half of the weight from the other undernourished groups (Table III). It was observed that the hepatic protein concentration was similar in C and GL(+)M groups, while the PGGL and GL(-)M groups showed a lower concentration protein, when compared to above groups (C and GL(+)M) . Was observed the lowest DNA concentration in GL(+)M group. The highest hepatic glycogen concentration was observed in undernourished since the pregestational period and the undernourished groups only during the gestational and lactational time presented lower glycogen concentration than the control group (Table III).

We also studied the effects of undernutrition on serum lipid parameters. In table V, we observed that the levels of total cholesterol, LDL-C and HDL-C were increased in PGGL and in GL(-)M groups, while the GL(+)M group presented the serum cholesterol concentration similar to C group. It was observed an important increase in LDL-C in GL(-)M rats. The serum triglycerides concentration was decreased in PGGL and in GL(+)M groups, when compared to C and GL(-)M group. In liver, the cholesterol concentration was increased in all undernourished groups, while the triglycerides concentration was importantly reduced in GL(-)M rats. In the other undernourished groups (PGGL and GL(+)M), it was observed an increase in this parameter, when compared to C group.

DISCUSSION

Protein undernutrition has it most important consequences during the growth [23].

Deficiency of any one or more essential amino acid or deficient protein intake is characterized by negative nitrogen balance, weight loss and impaired growth [23]. In figure 1 we observed at age of 21 days, that all undernourished groups showed a reduced body weight since the first postnatal day, and the group fed with 7% of casein without supplementation of Met presented the smallest body weight. Indeed, the same effect was observed on brain weight, at 21 days-old rats. Souza et al.[9], working with experimental groups feed with undernutrition models containing 8% protein (with or without Met) observed that all diet groups had different cerebellar weights and the degrees of undernutrition were inversely proportional to cerebellar weights at ages of 7, 21 and 75 days.

The liver weight was lower in all protein restricted groups (7% protein), with the GL(-)M presenting, at 21 days of age, 83% of the liver weight of control group (Table III). The liver protein concentration in PGGL and GL(-)M groups was lower than the other groups, however, the DNA concentration was equal to the control for these two groups. Zamanhof et al. [26] found reduced cell division in all undernourished fetal organs studied, including the brain. The present study shows a delay in cellular division in the liver of rats fed with diet with low protein and with Met supplementation.

The reduction in cerebellar and brain growth is proportionally smaller than the reduction of body growth, whether the undernutrition is imposed during pre and postnatal or exclusively postnatal period [24]. The organ growth can be observed through the relation protein/DNA as estimate referrals of the cellular size [12]. Fish and Winick [25] and Souza et al. [9] also detected an increased in DNA concentration in cerebellum of 21-day-old undernourished rats and without Met supplementation to the diet. This fact can be explained by a delay in cerebellum maturation and a decrease in cell's dimension. In agreement with

other studies [26-27], undernutrition acts also by delaying cell division with prolongation of total cell cycle time in some organs [9].

Protein restriction during critical periods of development can lead to a reduction in the size of organs and tissues with changes in activity of enzymes associated with glucose metabolism [10]. Regarding glycide metabolism, undernutrition usually leads to a disturbance of the glucose homeostasis, causing hypoglycemia, which is not necessarily related to a low concentration of hepatic glycogen [28]. In table IV we observed a decrease in glucose and albumin concentration in undernourished groups.

In rats during lactation, gluconeogenesis is the predominant pathway for the hepatic production of glucose, since the glycogen concentration in liver is small [29]. However, table III shows that at age of 21 postnatal days, the PGGL group presented an increase of the hepatic glycogen concentration compared to normally fed rats of the same age. This fact can be explicable either for the rise in glycogen synthases activity, or due to a higher sensitivity to insulin in the undernourished rats [30].

During lactation, the lipids from the mother's milk keep the postnatal hyperketonemia [31]; indeed, as soon as lactation begins, the newborn receives a high lipid contents and low carbohydrate content [32]. The conditions of extreme hyperlipolysis and hypoalbuminemia seen for the undernourished groups of the rats have been noted in both the human small-for-gestational age neonate and marasmatic infant as part of metabolic adaptations to severe uterus or postnatal undernutrition. The hyperlipolysis of adipose tissue in malnourished humans or rats indicates inadequate energy, which is compensated for by the conversion of non-esterified fatty acids to ketone bodies [33]. The fatty acids and ketonic bodies may guarantee the energetic homeostasis, as alternative subtracts to the glucose to tissues

development and growth [34]. Gusmán et al [35] have reported that maternal protein undernutrition leads to the appearance of hyperketonemia in rat pup and alterations in the properties of hepatic CPT-1 may be involved with this fact. Pre- and postnatal administration of the low-protein diet increased CPT-1 activity in pup and make this enzyme less sensitive to malonyl-CoA, which permit the consequent hepatic ketogenesis [35].

As can be observed in table V, the three types of undernutrition provoked an important increase in hepatic cholesterol concentration. In exception to GL(+)M group, the other undernourished groups showed an increase in cholesterolemia, compared to control group (25% protein). Moundras et al. [36] found a discrete increase in plasma cholesterol of rats submitted during 21 days to diets containing 8% of casein, compared to groups that received 16% and 32% of casein, during the same time. Indeed, undernourished group presented an increase in hepatic HMG CoA activity. This result, in part, could justify our results.

The plasma triglyceride concentration decreased markedly in undernourished group with Met, compared to control group (table V). Our results are in according to Madani et al. (37) that showed an important decrease in the plasma total VLDL and triglycerides concentration, in rats submitted to diets containing 10% of casein compared to diet with 20% and 30% of casein. Shaw and Huang [38] showed that rats that received a diet containing 8% of lactoalbumin during six weeks, presented rate of secretion α -tocoferol in VLDL, secretion and activities of lipases (lipoprotein lipase and free total lipase by heparin) in the plasma and hepatic lipase only 50-60% that observed in the rat feeding with diet containing normal protein level.

In GL(-)M group (table V), there was a significant reduction in the hepatic triglyceride concentration, compared to other groups. Noda and Okita [39] showed that undernourished

rats, during lactational period, presented at 21 postnatal days higher hepatic triglyceride concentration, when Met was added to the diet. Azevedo et al. [40] and Noda and Okita (1980) showed that the Met supplementation to diets offered during the lactational period to undernourished 21 days-old rats, induced an increase in lipid synthesis from acetate. In this research, it is showed that the three-undernutrition models changes markedly the liver and plasma lipid content and it is due to multiple factors including Met supplementation.

Furthermore, morphological studies showed that offspring of dams fed on the low protein diet throughout pregnancy and lactation had reduced number of pancreatic β -cells but increased α -cells [41]. This fact in addition to higher lipids of plasma can increase a lipid peroxidation found in the diabetic liver and may also play a role in the teratogenic effects of diabetes in the future life of these rats [42].

Then, in this study was observed that the undernutrition group feed without Met in the diet was the more prejudicial, in the analysed parameters CNS correlated.

Several hepatic parameters showed morphological and metabolic changes caused by undernutrition in the early life. These changes can confirm the appearance of risk factors to chronic degenerative diseases chance like high arterial pressure, arteriosclerosis, non-insulin-dependent diabetes mellitus and cardiovascular problems, all related with arise of the metabolic syndrome in the later life.

REFERENCES

- [1] Berg B N. Dietary restriction and reproduction in the rat. *J. Nutr* 1965; 87: 344-8.
- [2] Barja G, Lopez-Torres M, Gredilla R, Sanz A. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(9): 882-9.
- [3] Welberg L A, Seckl J R. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol* 2001; 13(2): 113-28.
- [4] Fowden A L, Forhead A J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* 2004; 127(5): 515-26.
- [5] Holness M J, Langdown M L, Sugden M C. Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of Type 2 diabetes mellitus. *Biochem J.* 2000; 349 (3): 657-65.
- [6] Barja-Fidalgo C, Souza E P, Silva S V, Rodrigues A L, Anjos-Valotta E A, Sannomyia P, De Freitas M S, Moura A S. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. *Inflamm Res* 2003; 52(11): 470-6.
- [7] Torún B, Chew F. Protein-energy malnutrition. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, editors. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p. 950-76.
- [8] Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr* 1998;128(2): 401-6.
- [9] Souza K B, Feoli A M, Krüger A H, Souza M R, Perry T C, Rotta L, Souza D O, Perry M L

- S. Effects of undernutrition on glycine metabolism in the cerebellum of rats. *Nutr Metab* 2004; 48: 246-50.
- [10] Desai M, Crowther N J, Lucas A. Organ selective growth in the offspring of protein restricted mothers. *Br J Nutr* 1996 ; 76: 591-603.
- [11] Kern M, Beauttenmuller D, Diehl S, McCormick, C, Ambrose M. The effects of protein repletion at varied level on the growth and nutritional status of protein restricted rats. *Nutr Res* 2002; 22: 927-63.
- [12] Winick M, Noble A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr* 1966; 89: 300-6.
- [13] Azzolin I R, Bernard E A, Trindade V M, Gamallo J L, Perry M L. Effect of protein malnutrition on glycoprotein, protein and lipid synthesis in the rat cerebellum during the period of brain growth spurt. *Ann Nutr Metab* 1991; 35(2): 82-8.
- [14] Vitiello F, Legrand J, Cioffi L, Gombos G. Comparison of effect of early undernutrition imposed by two different methods on rat cerebellar development. *Biochem Soc Trans* 1985; 13: 759-60.
- [15] McGarry J D, Kuwajima M, Newgard C B, Foster D W, Katz J. From dietary glucose to liver glycogen: the full circle round. *Ann Rev Nutr* 1987; 7: 51-73.
- [16] Moura J J, Sola S, Brito M A, Brites D, Rodrigues C M. Membrane structural changes support the involvement of mitochondria in the bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. *Clin Sci (Lond)* 2002;103(5): 475-85.
- [17] Krisman C R. A method for colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Analyt Biochem* 1962; 4: 17-23.
- [18] Folch J, Lee M, Stanley G H. A simple method for isolation and purification of total lipids

for animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.

[19] Bergmeyer H U. *Methods of enzymatic analysis*. 3rd ed. Verlag Chemie: Weinheim, 1983. p. 141--8.

[20] Soloni F G. Simplified manual micro method for determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 1971; 17: 529-34.

[21] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 193: 265-72.

[22] Burton K. A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 1956; 311: 315-323.

[23] Joshi S, Garole V, Daware M, Girigosavi S, Rao S. Maternal protein restriction before pregnancy affects vital organs of offspring in Wistar rats. *Metabolism* 2003; 52: 13-18.

[24] Brown M L, Guthrie M A. Effect of severe undernutrition in early life upon body and organ weights in adult rats. *Growth* 1968; 32: 143-150.

[25] Fish I, Winick M. Effect of malnutrition on regional growth of developing rat brain. *Expl Neurol* 1969; 25: 534-40.

[26] Zamanhof S, Van Marthens E, Margolis F. DNA (cell number) and protein in neonatal brain: Alterations by maternal dietary protein restriction. *Science* 1968; 160: 322-23.

[27] Shimada M, Yamano T, Nakamura T, Morikawa Y, Kusunoki T. Effect of maternal malnutrition on matrix cell proliferation in the cerebrum of mouse embryo. *Pediatr Res* 1977; 11: 728 -31.

[28] Heard C R C. The effects of protein-energy malnutrition on blood glucose homeostasis. *Wld.Rev. Nutr. Diet* 1978; 30: 107-47.

[29] Girard J. Glugoneogenesis in late fetal and early neonatal life. *Biol. Neonate* 1986; 50:

237-58.

[30] Azzolin I R. Metabolismo do glicogênio hepático de ratos de 7 dias de idade provenientes de ratas submetidas a desnutrição protéica. Tese, Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999, 131p.

[31] Duée P H, Pégorier J P, El Manoubi L, Ferré P, Boys-Joyeux B, Girard J. Development of gluconeogenesis from different substrates in newborn rabbit hepatocytes. *J Dev Physiol* 1986; 8: 387-94.

[32] Luckey T D, Mende T J, Pleasants J. The physical and chemical characterization of rat's milk. *J Nutr* 1954; 54: 345-59.

[33] Morgane P J, Resnick O. Generational effects of protein malnutrition in the rat. *Dev Brain Res* 1984; 15: 219-27.

[34] Herrera M G, Kamm D, Ruderman N, Cahill G F. Non-hormonal factors in the control of glucogenesis. *Adv Enz Regul* 1966; 4: 225-35.

[35] Guzmán M, Azzolin I R, Moulin C C, Perry M L S. Pre- and postnatal protein undernutrition increases hepatic carnitine palmitoyltransferase I activity and decreases enzyme sensitivity to inhibitors in the suckling rat. *Horm Metab Res* 1992; 24: 471-73.

[36] Moundras C, Remesy C, Levrat MA, Demigne C. Methionine deficiency in rats fed soy protein induces hypercholesterolemia and potentiates lipoprotein susceptibility to peroxidation *Metabolism* 1995;44(9): 1146-52.

[37] Madani S, Prost J, Belleville J. Dietary protein level and origin (casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma lipid transport, and antioxidative defense status in the rat. *Nutrition* 2000 16(5): 368-75.

- [38] Shaw H M, Huang C J. Secretion of alpha-tocopherol in VLDL is decreased by dietary protein insufficiency in young growing rats. *J Nutr* 2000; 130(12): 3050-4.
- [39] Noda K and Okita T. Fatty liver due to disproportionally added methionine to a low soybean diet and lipotropic action of phosphatides in rats. *J Nutr* 1980 110(3): 505-12.
- [40] Azevedo A M, Azzolin I R, Perry M L S. Effect of methionine supplementation to a low-soybean protein diet on liver lipid metabolism. *Ann Nutr Metab.* 1994; 38(5):301-6.
- [41] Berney D M, Desai M, Palmer D J, Greewald S, Brown A, Hales C N, Berry C L. The effects of maternal protein deprivation on the fetal pancreas: major structural changes and their recuperation. *J Pathol* 1997; 183: 109-15.
- [42] Viana M, Aruoma O I, Herrera E, Bonet B. Oxidative damage in pregnant diabetic rats and their embryos. *Free Radic Biol Med* 2000;29(11): 1115-21.
- [43] Horwitz W. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC 1980.

FIGURES

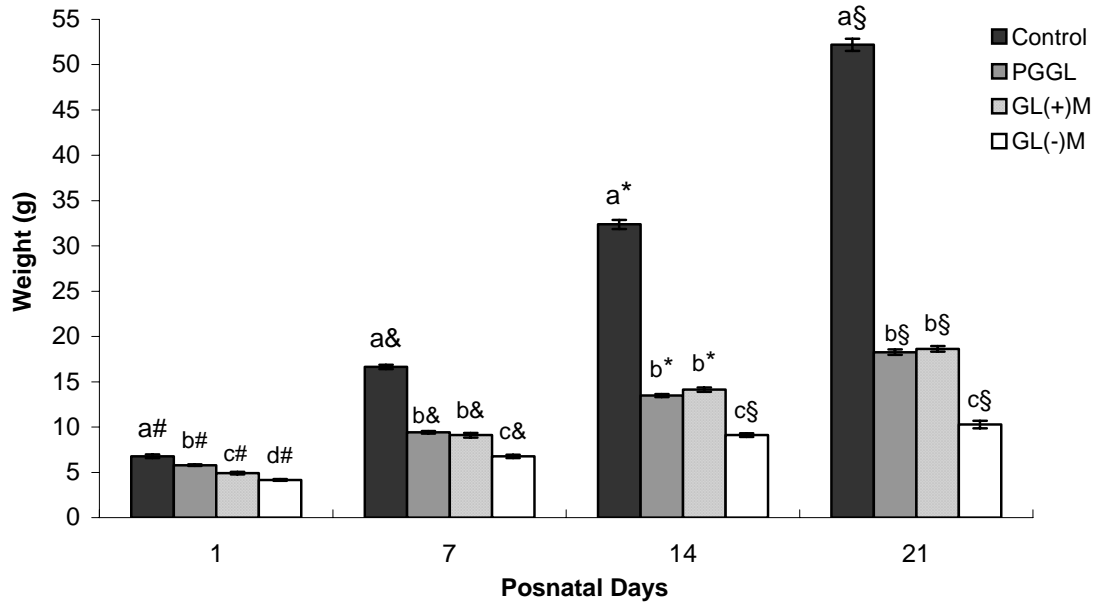


Fig. 1 - Effect of undernutrition on body weight at 1°, 7°, 14°, 21° days of life.

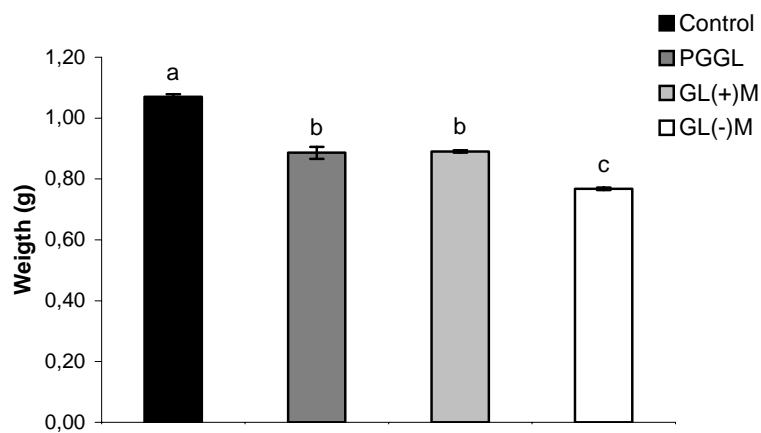


Fig. 2 - Effect of undernutrition on brain weight in 21 days old rats.

Table 1 - Nutritional composition of the diets (g/Kg diet).

Component	Casein diet	
	25%	7%
Casein (87% protein) ^a	287	80.50
Fat (soybean oil)	150	150
Carbohydrate (corn starch)	501.5	708
Salt mix ^b	40	40
Vitamin mix ^c	10	10
L-Metionine	1.5	1.5
Non-nutritive fiber	10	10

Note: Salt and vitamin compositions are according to Horwitz (43). Energy for both diets: 4.3 kcal/g diet.

^a Casein, purity 87% (from Farmaquímica, Porto Alegre/RS, Brazil)

L-Methionine (from Merck, Rio de Janeiro, Brazil)

^b Mineral mixture (from Roche, São Paulo, Brazil) mg/100g of ration: NaCl, 557; KI, 3.2; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄.7H₂O, 108; MnSO₄.H₂O, 16; ZnSO₄.7H₂O, 2.2; CuSO₄.5H₂O, 1.9; CoCl₂.6H₂O, 0.09.

^c Vitamin mixture (from Roche, São Paulo, Brazil), mg/100g of ration: Vitamin A, 4; Vitamin D, 0.5; Vitamin E, 10; Menadione, 0.5; Choline, 200; PABA, 10; Inositol, 10; Niacin, 4; Pantothenic acid, 4; Riboflavin, 0.8; Thiamin, 0.5; Pyridoxine, 0.5; Folic acid, 0.2; Biotin, 0.04; Vitamin B12, 0.003.

Table 2. Effect of undernutrition on cerebellar weight, protein and DNA concentration in 21 days-old rats, fed with different diets.

Diet	Weight (g)	Protein (mg%)	DNA ($\mu\text{g}\%$)
Control	0.223 ± 0.009^b	16.50 ± 0.29^a	782.81 ± 10.59^a
PGGL	0.178 ± 0.003^a	15.76 ± 0.33^a	834.31 ± 17.94^a
GL(+M)	0.172 ± 0.004^a	16.04 ± 0.31^a	766.00 ± 33.28^a
GL(-)M	0.125 ± 0.004^c	13.01 ± 0.34^b	1141.43 ± 36.88^b

Data are expressed as mean \pm SEM, n = 22. Different letters indicate statistic differences between distinct diets by ANOVA with posthoc Duncan's test (p < 0.01).

Table 3. Effect of undernutrition on liver weight, protein, DNA and glycogen concentration in 21 days-old rats, fed with different diets.

Diet	Weight (g)	Protein (mg%)	DNA ($\mu\text{g}\%$)	Glycogen (mg%)
Control	2.15 ± 0.05^a	15.99 ± 0.17^a	491.30 ± 15.34^a	6.81 ± 0.24^b
PGGL	0.67 ± 0.01^b	12.70 ± 0.26^b	505.38 ± 16.52^a	9.26 ± 0.25^a
GL(+M)	0.65 ± 0.02^b	15.82 ± 0.44^a	375.33 ± 16.41^b	4.35 ± 4.44^c
GL(-)M	0.36 ± 0.02^c	12.21 ± 0.22^b	472.77 ± 11.89^a	5.23 ± 0.45^c

Data are expressed as mean \pm SEM, n = 20. Different letters indicate statistic differences between distinct diets by ANOVA with posthoc Duncan's test (p < 0.01). C: control group; PGGL: pregestational, gestational and lactational group; GL(+M): gestational and lactational with Met supplementation; GL(-)M: gestational and lactational without Met supplementation.

Table 4. Effect of undernutrition on plasma glucose and serum albumin, in 21 days-old rats, fed with different diets.

Diet	Glucose (mmol/L)	Albumin (mmol/L)
Control	8.28 ± 0.19 ^a	0.42 ± 0.004 ^a
PGGL	6.87 ± 0.23 ^b	0.30 ± 0.006 ^b
GL(+M)	5.77 ± 0.29 ^c	0.35 ± 0.008 ^c
GL(-)M	6.31 ± 0.13 ^{bc}	0.34 ± 0.007 ^c

Data are expressed as mean ± SEM, n = 12. Different letters indicate statistic differences among distinct diets by ANOVA with posthoc Duncan's test (p < 0.01). C: control group; PGGL: pregestational, gestational and lactational group; GL(+M): gestational and lactational with Met supplementation; GL(-)M: gestational and lactational without Met supplementation.

Table 5. Effect of undernutrition on serum and liver lipids concentration of 21 days-old rats fed with different diets.

Groups	Serum (mmol/L)				Liver (μmol/g)	
	Cholesterol	HDL-C	LDL-C	Triglycerides	Cholesterol	Triglycerides
Control	2.90 ± 0.12 ^c	1.50 ± 0.04 ^c	0.60 ± 0.04 ^b	1.87 ± 0.06 ^a	2.37 ± 0.15 ^c	14.15 ± 1.37 ^b
PGGL	5.42 ± 0.62 ^b	2.21 ± 0.08 ^b	1.83 ± 0.10 ^c	0.97 ± 0.03 ^b	4.46 ± 0.15 ^b	20.52 ± 1.75 ^a
GL(+M)	2.89 ± 0.26 ^c	1.58 ± 0.12 ^c	1.07 ± 0.08 ^b	0.44 ± 0.02 ^c	5.80 ± 0.15 ^a	20.31 ± 1.69 ^a
GL(-)M	9.72 ± 0.48 ^a	3.25 ± 0.15 ^a	5.81 ± 0.30 ^a	1.67 ± 0.04 ^a	4.09 ± 0.23 ^b	3.98 ± 0.43 ^c

Data are expressed as mean ± SEM, n = 13. Different letters indicate statistic differences among distinct diets by ANOVA with posthoc Duncan's test (p < 0.01). C: control group; PGGL: pregestational, gestational and lactational group; GL(+M): gestational and lactational with Met supplementation; GL(-)M: gestational and lactational without Met supplementation.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Effect of undernutrition on body weight at 1°, 7°, 14°, 21° days of life.

Note: Data are expressed as mean \pm SEM, n = 37. Different letters indicate differences among distinct diets within the same postnatal day, and different symbols indicate differences among distinct ages within the same diet, by ANOVA with post hoc Duncan's test ($p < 0.01$). C: control group; PGGL: pregestational, gestational and lactational group; GL(+)M: gestational and lactational with Met supplementation; GL(-)M: gestational and lactational without Met supplementation.

Fig. 2. Effect of undernutrition on brain weight in 21 days old rats.

Note: Data are expressed as mean \pm SEM, n =10. Different letters indicate statistic differences between distinct diets by ANOVA with posthoc Duncan's test ($p < 0.01$). C: control group; PGGL: pregestational, gestational and lactational group; GL(+)M: gestational and lactational with Met supplementation; GL(-)M: gestational and lactational without Met supplementation.

IV – DISCUSSÃO

Utilizamos ratos Wistar de 21 dias cujas mães foram submetidas à desnutrição protéica pré-gestacional, imposta 5 semanas antes da gestação e a mesma mantida durante todo período de gestação e lactação (denominado grupo PGGL: pré-gestacional, gestacional e lactacional). Outros dois grupos desnutridos foram mantidos com dietas hipoprotéicas nos períodos de gestação e lactação e as mesmas foram suplementadas ou não com metionina, sendo respectivamente chamados de grupo desnutrido durante o período gestacional e lactacional com e sem adição de metionina: grupos GL(+)M ou GL(-)M, respectivamente.

A desnutrição imposta em períodos de desenvolvimento embrionário bem como durante a fase de lactação pode provocar alterações metabólicas nos filhotes e desenvolver fatores de risco para diversas doenças na vida adulta, motivos que contribuíram para a escolha do tema desta Dissertação.

Nossos resultados indicam que, conforme a literatura, a desnutrição materna afeta não só o crescimento corporal, mas também o tamanho de alguns órgãos que são mais ou menos preservados, de acordo com as prioridades do organismo. A dieta com 7% de caseína, sem adição de metionina e utilizada nos períodos de gestação e lactação provocou uma acentuada diminuição das massas corporal, cerebral, hepática e cerebelar aos 21 dias, comparada com o grupo controle. Embora os grupos PGGL e GL(+)M não tenham apresentado diferença entre si, nestes parâmetros, percebeu-se uma diminuição de aproximadamente 60% do peso corporal em comparação com o grupo controle, sendo que os pesos cerebral e cerebelar também foram menores, porém com uma menor diferença do

que aquela observada sobre o peso corporal. Isto mostra que alguns órgãos, principalmente as estruturas que compõem o SNC, são relativamente protegidos dos efeitos da desnutrição.

A massa hepática também foi menor em todos os grupos com restrição protéica, sendo também observadas hipoglicemia e hipoalbuminemia. A diminuição da glicemia, encontrada nos grupos de ratos desnutridos, pode sugerir que estes animais sejam mais sensíveis à insulina ou já apresentem alterações no número de células- β pancreáticas, e com isso, diferenças na secreção de insulina. Um número reduzido de células- β pancreáticas e aumento das células α -pancreáticas foi observado em ratos no período de lactação, provenientes de mães submetidas à desnutrição protéica durante os períodos gestacional e lactacional (Berney *et al.*, 1997).

A hipoalbuminemia está relacionada à falta de substrato protéico para síntese de albumina ou a uma menor capacidade de síntese desta proteína, sendo que o menor valor encontrado neste trabalho foi observado no grupo PGGL, indicando que neste tipo de desnutrição crônica pode haver um decréscimo da transcrição do gene da albumina expresso pelo fígado (Ogawa *et al.*, 1997; Marten *et al.*, 1996). Considerando a elevada concentração de DNA cerebelar e a menor concentração de proteínas observadas no grupo GL(-)M, se pode especular que haja um atraso na maturação e que as células apresentem menor volume. A menor concentração hepática de DNA foi observada no grupo GL(+)M, embora a concentração protéica neste grupo não tenha diferido do controle. Azzolin *et al.* (1991) mostraram que a concentração cerebelar de DNA foi maior nos ratos controle aos 7 e 15 dias de idade, do que nos ratos desnutridos, enquanto que aos 21 dias esta concentração foi maior nos ratos desnutridos. Aos 21 dias o grupo de ratos desnutridos apresentou maior concentração de DNA, com atraso nos processos de divisão celular no cerebelo (Souza *et*

al., 2004).

A concentração protéica hepática dos grupos PGGL e GL(-)M foi menor e pode estar refletindo os prejuízos na síntese protéica provocada pela desnutrição crônica e pela falta de um aminoácido essencial. A metionina é necessária para o crescimento normal dos mamíferos por sua utilização na síntese de proteínas e S-adenosilmetionina, sendo que uma diminuição na concentração de S-adenosilmetionina ocasiona um decréscimo na metilação de diversos substratos que são importantes para um perfeito funcionamento do organismo.

A gliconeogênese em ratos durante o período de lactação é a via predominante para produção hepática de glicose, uma vez que a concentração de glicogênio no fígado é pequena neste período. Contudo, nossos estudos mostraram que o grupo PGGL apresentou uma concentração hepática de glicogênio, superior àquela observada nos ratos controle, o que, provavelmente possa estar relacionado ao aumento da síntese de glicogênio e diminuição da capacidade de mobilização. O mesmo foi observado em estudo de Azzolin (1999) que mostrou um aumento da atividade das enzimas glicogênio sintetases, estimuladas pela insulina. Nos dois grupos desnutridos durante os períodos gestacional e lactacional GL(+)M e GL(-)M observou-se que a concentração de glicogênio hepático foi inferior à observada no grupo controle e não foi mostrada diferença entre estes grupos, neste parâmetro, sugerindo que a metionina não exerce influência significativa no metabolismo do glicogênio de ratos de 21 dias.

Os trabalhos de Madani *et al.* (2000) e de Nassir *et al.* (1997) mostraram que a concentração protéica da dieta altera o metabolismo lipídico em ratos. A má nutrição protéica (2% versus 20% de caseína), resultou em marcada redução na concentração de triglicerídeos plasmáticos e foi correlacionada com o acúmulo destes lipídios no fígado

(Meghelli-Bouchenak *et al.*, 1987; Bouziane *et al.*, 1994). A reduzida síntese de apolipoproteínas para a formação de VLDL é responsável pelo acúmulo de lipídios no fígado (Meghelli-Bouchenak *et al.*, 1987). No período lactacional, os lipídios do leite materno mantêm uma hipercetonemia pós-natal (Duée, 1986), que é característica do rato em lactação. No entanto, sob condições de desnutrição, nas quais ocorre hiperlipólise e hipoalbuminemia, a conversão de ácidos graxos não esterificados em corpos cetônicos é ainda mais intensa, para que seja mantida a homeostase energética. Os corpos cetônicos são importantes substratos energéticos para o desenvolvimento e crescimento dos órgãos que dependem de glicose, como o cérebro. Além disso, Gúzman *et al.* (1992), relataram que a desnutrição protéica materna permite o aparecimento da hipercetonemia nos ratos filhotes e que alterações nas propriedades hepáticas da enzima CPT-1 (carnitina-palmitoil-transferase 1) pode estar envolvida neste fato. A desnutrição protéica no período pré- e pós-natal aumenta a atividade da CPT-1 no fígado dos filhotes e faz com que esta enzima seja menos sensível ao malonil-CoA, o que permite intensa cetogênese hepática.

A concentração hepática de colesterol total, dos três grupos submetidos à restrição protéica, foi elevada, assim como os triglicerídeos dos grupos GL(+)M, em relação ao grupo normonutrido. A concentração de triglicerídeos hepáticos do grupo GL(-)M foi aproximadamente 5 vezes menor do que a do grupo controle, enquanto a concentração de triglicerídeos plasmáticos deste grupo não diferiu do controle, o que mostra a intensa mobilização de ácidos graxos que podem ser convertidos em corpos cetônicos nestes animais, ou ainda, sugerindo que a capacidade de exportação de lipídios pelo fígado não é alterada. Os níveis séricos de triglicerídeos nos outros dois grupos desnutridos foram inferiores aos do controle, sendo que o menor valor foi encontrado no grupo GL(+)M, embora

este grupo tenha apresentado valores de colesterol plasmático semelhantes aos valores do grupo controle. Madani *et al.* (2000) observaram que dietas contendo baixa concentração de caseína (10%) apresentaram uma marcada redução na concentração plasmática de triglicerídeos, principalmente em VLDL, enquanto Nassir *et al.* (1997) também encontraram uma baixa concentração de triglicerídeos plasmáticos e de VLDL em ratos alimentados com dietas contendo 8% de caseína, comparados aos alimentados com 16% e 32% de caseína. Shaw e Huang (2000) mostraram que ratos alimentados com dieta contendo 8% de lactoalbumina, o índice de secreção de α -tocoferol em VLDL e as atividades de lipases (lipase lipoprotéica e lipase total liberada por heparina) em plasma e da lipase hepática, foram somente 50-60% daquelas observadas em ratos alimentados com dieta contendo quantidades adequadas de proteína.

A mais elevada concentração plasmática de colesterol total foi observada no GL(-)M. Provavelmente, o aumento do LDL-c também encontrado neste grupo possa favorecer a hipótese de que haja uma diminuição na expressão de receptores de LDL-c no hepatócito, os quais têm importância fundamental nos níveis de manutenção de LDL-c. Madani *et al.* (2000) observaram que os níveis de proteína na dieta não provocaram alterações na concentração plasmática de colesterol total, independente do tipo de fonte protéica estudada (proteína de soja ou caseína). Entretanto, Okita e Sugano (1990) observaram menor concentração plasmática de colesterol em animais alimentados com dieta contendo proteína de soja não purificada, em relação aos animais alimentados com caseína, fato que pode ser atribuído às diferenças no tipo de proteína de soja utilizada. Lipídios plasmáticos e hepáticos foram significativamente alterados pelos níveis dietéticos de caseína, mas eles foram menos responsivos em relação a alterações na quantidade de proteína de soja na dieta (Madani *et*

al., 2000). Ratos alimentados com dietas contendo 10% de caseína apresentaram níveis significativamente menores de Apo A-I na fração HDL₂₋₃ (apesar da massa de HDL₂₋₃), sugerindo uma diminuição no número de partículas de HDL₂₋₃, provavelmente resultando de uma síntese diminuída (Madani *et al.*, 2000). Nesse trabalho, os autores mostraram que os níveis de ApoB (B-100 e B-48) em VLDL foram aumentados com crescentes quantidades de caseína na dieta, o que provavelmente reflete um aumento na síntese de VLDL pelo fígado, além da fração definida como HDL-LDL₁. Gouache *et al.* (1991) e Meghelli-Bouchenak *et al.* (1987) mostraram que severa deficiência de proteína na dieta (inferior a 6g de caseína /100g ração), em ratos, resultou em significativa diminuição nos níveis de apo B e C, as principais apolipoproteínas do VLDL. Uma diminuição na síntese de apolipoproteína no fígado é considerada a principal causa de “fígado gordo” na má nutrição severa (como kwashiorkor).

Noda e Okita (1980) mostraram que ratos desnutridos com dietas contendo 8% de proteína de soja, adicionadas de metionina, apresentaram um acúmulo de triglicerídeos hepáticos e uma maior incorporação *in vitro* de [1-¹⁴C]acetato na fração lipídica. Os fosfolipídeos, provavelmente aqueles produzidos a partir da colina, podem ser um fator limitante para o transporte de lipídeos a partir do fígado de ratos alimentados com dieta hipoprotéica adicionada de metionina.

As alterações causadas por diferentes modelos de desnutrição protéica, mostradas neste trabalho, juntamente com o aumento de lipídios no plasma podem aumentar a peroxidação lipídica, altamente relacionada com os efeitos etiopatogênicos do Diabetes *mellitus* tipo II, arteriosclerose, hipertensão e outras doenças que podem potencializar fatores de risco para o desenvolvimento da Síndrome Metabólica na vida adulta destes ratos.

Os resultados encontrados neste trabalho, que estão de acordo com outros estudos

realizados sobre desnutrição protéica, tanto na vida intra-uterina, quanto no período pós-natal podem levantar hipóteses sobre o aparecimento das doenças crônico-degenerativas também em humanos. O período e o tempo em que a desnutrição é estabelecida pode “programar” alterações nas funções metabólicas, muitas vezes de maneira irreversível, salientando então a importância do manejo dietético adequado nesses períodos e a gravidade da desnutrição protéica infantil.

V - CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitem observar que a desnutrição protéica materna, imposta em diferentes períodos e em diferentes níveis de severidade, influencia significativamente o crescimento e o desenvolvimento dos filhotes, causando adaptações e alterações metabólicas.

Os ratos desnutridos durante a gestação e lactação, cuja dieta oferecida às mães não foi adicionada de metionina, foram os mais prejudicados, principalmente na massa corporal e dos órgãos, além do metabolismo lipídico. Além disso, a desnutrição provocou atraso na maturação do cerebelo e observou-se que o SNC é parcialmente protegido da desnutrição, quando comparado com outros tecidos.

O metabolismo dos filhotes do grupo submetido à desnutrição materna pré-gestacional, gestacional e lactacional sofreu uma série de adaptações, de forma que alguns resultados experimentais se assemelharam com os do grupo submetido à desnutrição protéica adicionada de metionina nos períodos de gestação e lactação.

Contudo, as ratas mães submetidas à desnutrição protéica nos três períodos, passaram o maior tempo expostas ao déficit protéico e geraram filhotes desnutridos de um modo mais crônico.

Os reflexos observados sobre o metabolismo do glicogênio, glicemia e colesterol hepático nos filhotes PGGL levam à hipótese de que estes animais possam ser mais predispostos, na vida adulta, aos fatores de risco das doenças relacionadas com a Síndrome

Metabólica, já descrita por vários autores.

Por fim, concluímos que a desnutrição materna realmente apresenta efeitos deletérios no metabolismo dos filhotes. Aos 21 dias de idade, além da aparência prejudicada, os resultados bioquímicos encontrados comprovam a severidade do déficit protéico estabelecido durante o desenvolvimento. As conseqüências desses modelos de desnutrição podem ter grandes repercussões na vida adulta destes animais, sugerindo que a desnutrição protéica pode determinar o surgimento de doenças crônico-degenerativas.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alleyne, G.A.O.; Hay, R.W.; Picou, D.I.; Stanfield, J.P. and Whitehead R.G. **Protein- energy Malnutrition**. London: Edward Arnold Ltda, 1977, p54-92.

Altman, J.G.D. and Sudarshan, K. **The influence of nutrition on neural behavioral development . Critical review of some data on the growth of the body following dietary deprivation during gestational and lactation**. Dev Psychob 1970, 3:281-301.

Azevedo, A.M.P.; Azzolin, I.R.; Perry, M.L.S. **Effects of methionine supplementation to a low-soybean protein diet on liver lipid metabolism**. Nutr and Metab 1994, 38:301-6.

Azzolin, I.R.; Bernard, E.A.; Trindade, V.M.; Gamallo, J.L.; Perry, M.L.S. **Effect of protein malnutrition on glycoprotein, protein and lipid synthesis in the rat cerebellum during the period of brain growth spurt**. Ann Nutr Metab 1991, 35(2):82-8.

Azzolin, I.R.; Nagel, F.M.; Perry, M.L.S. **Pre- and post-natal protein undernutrition increases liver glicogen concentration and activity of glicogen synthases in the suckling rat**. Med Sci Res 1996, 24:759-61.

Azzolin, I.R. **Metabolismo do glicogênio hepático de ratos de 7 dias de idade provenientes de ratas submetidas a desnutrição protéica**. Tese, Instituto de ciências Básicas da Saúde - Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999, 131p.

Balazs, F.J. **The development of glucogenesis in rat. Controlling factors in the newborn**. Biochem J 1971, 124:265-74.

Balazs, R.; Patel, A.J. **Factors affecting the biochemical maturation of brain: effect of undernutrition during early life**. In: Ford, Neurobiological aspects of maturation and aging, progress in brain research. Elsevier: Amsterdam, 1973, 115-28.

Barker, D.J. **Fetal growth and adult disease**. Br J Obstet Gynecol 1992, 99(4):275-6.

Bennis-Taleb, N.; Remacle, C.; Hoet, J.J.; Reusens, B. **A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring**. J Nutr 1999, 129(8):1613-9.

Berney, D.M.; Desai, M.; Palmer, D.J.; Greewald, S.; Brown, A.; Hales, C.N.; Berry, C.L. **The effects of maternal protein deprivation on the fetal pancreas: major structural changes and their recuperation**. J Pathol 1997, 183:109-15.

Birch, H. **Functional effects of fetal malnutrition**. Hosp. Pract.March. 1971,134-148.

Bouziane, M.; Prost, J.; Belleville, J. **Dietary protein deficiency affects n-3 and n-6**

polyunsaturated fatty acids hepatic storage and very low density lipoprotein transport in rats on different diets. *Lipids* 1994, 29(4):265-72.

Burdge, G.C.; Delange, E.; Dubois, L.; Dunn, R.L.; Hanson, M.A.; Jackson, A.A.; Calder, P.C. **Effect of reduced maternal protein intake in pregnancy in the rat on the fatty acid composition of brain, liver, plasma, heart and lung phospholipids of the offspring after weaning.** *Br J Nutr* 2003, 90(2):345-52.

Cherif, H.; Reusens, B.; Dahri, S.; Remacle, C.; Hoet, J.J. **Stimulatory effects of taurine on insulin secretion by fetal rat islets cultured in vitro.** *J Endocrinol.* 1996, 151(3):501-6.

Clark, J.B.; Bates, T.E.; Cullingford, T.; Land, J.M. **Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain.** *Dev Neurosci* 1993, 15:174-80.

Cremer, J.E.; Teal, H.M.; Cunningham, V.J. **Inhibition, by 2-oxo acids that accumulate in maple-syrup-urine disease, of lactate, pyruvate and 3-hydroxybutyrate transport across the blood-brain barrier.** *J Neurochem* 1982, 39:674-7.

Crum, R.; Szabo, S.; Folkman, J. **A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment.** *Science* 1985, 230:1375-8.

Desai, M.; Crowther, N.J.; Lucas, A.; Hales, C.N. **Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers.** *Br J Nutr* 1996, 76(4):591-603.

Dobbing T.; Sands, J. **Vulnerability of developing brain. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth spurt.** *Biol Neonate* 1971, 19:363-78.

Dobbing, J.; Smart, J.L. **Vulnerability of developing brain and behavior.** *Br Med Bull* 1974, 30(2):164-8.

Dudášová, S.; Granciocová, E. **Influence of casein and soy flour proteins on amino acid content in the liver of experimental animals.** *Physiol Res* 1992, 41:411-6.

Duée, P.H.; Pégorier, J.P.; El Manoubi, L.; Ferré, P.; Boys-Joyeux, B.; Girard, J. **Development of gluconeogenesis from different substrates in newborn rabbit hepatocytes.** *J Dev Physiol* 1986, 8:387-94.

Duran, P.; Cintra, L.; Galler JR.; Tonkiss, J. **Prenatal protein malnutrition induces a phase shift advance of the spontaneous locomotor rhythm and alters the rest/activity ratio in adult rats.** *Nutr Neurosci.* 2005, 8(3):167-72.

El Khattabi, I.; Gregoire, F.; Remacle, C.; Reusens, B. **Isocaloric maternal low-protein diet alters IGF-I, IGF-BPs, and hepatocyte proliferation in the fetal rat.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003, 285:E991-E1000.

Etukudo, M.; Agbedana, O.; Akang, E.; Osifo, B. **Biochemical Changes and liver tissue pathology in weanling albino rats with protein-energy malnutrition (PEM).** *Afr J Med Sci* 1999, 28(1-2):43-7.

Fernandez-Twinn, D.S.; Ozanne, S.E.; Ekizoglou, S.; Doherty, C.; James, L.; Gusterson, B.; Hales, C.N. **The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction.** Br J Nutr 2003, 90(4):815-22.

Finkelstein, J.; Kyle, W.E.; Harris, B.J.; Martin, J.J. **Methionine metabolism in mammals: concentration of metabolites in rat tissues.** J Nutr 1982, 112:1011-18.

Finkelstein, J.; Martin, J.; Harris, B. **Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cystine.** J Biol Chem 1988, 263(24):11750-4.

Finkelstein, J.D. **Methionine metabolism in mammals.** J Nutr Biochem 1990,1:228-37.

Fish, I.; Wink, M. **Effect of malnutrition on regional growth of developing rat brain.** Expl Neurol 1969, 25:534-40.

Frazer, J.F.D.; Huggett, A. **The partition of nutrients between mother and conceptuses in the pregnant rat.** J Physiol 1970, 207:783-8.

Girard, J.; Ferré, P. **Metabolic and hormonal changes around birth.** In: Biochemical Development of the fetus and neonate, C.T. Jones (editor). Amsterdam: Elsevier, 1982, p. 517-551.

Girard, J. **Glugoneogenesis in late fetal and early neonatal life.** Biol Neon 1986, 50:237-58.

Gorman, L.; Mercer, L.; Henning, B. **Growth requirements of endothelial cells in culture: variation in serum and amino acid concentration.** Nutrition. 1996, 12:266-70.

Gouache, P.; Le Moullac, B.; Bleiberg-Daniel, F.; Aubert, R.; Flament, C. **Changes in rat plasma apolipoproteins and lipoproteins during moderate protein deficiency: potential use in the assessment of nutritional status.** J Nutr 1991, 121(5):653-62.

Greenwood, C.E.; Craig, R.E.A. **Dietary Influences on Brain Function: Implications During Periods of Neuronal Maturation.** In: Liss. A.R. Current topics in nutrition and disease: Basic and clinical aspects of nutrition and brain development. vol. 16. New York: Allan R. Liss Inc,1987, p 161-199.

Gumucio, J.J.; Miller, D.L.. **Liver cell heterogeneity.** In: Arias, I; Popper,H; Schachter, D. and Shafritz, D.A. The liver: Biology and pathology. New York: Raven press, 1982, p.647-61.

Guzmán, M.; Azzolin, I.R.; Moulin, C.C.; Perry, M.L.S. **Pre-and postnatal protein undernutrition increases hepatic carnitine palmitoyltransferase I activity and decreases enzyme sensitivity to inhibitors in the suckling rat.** Horm Metab Res 1992, 24:471-3.

Hardwick, D.F.; Hove, D.A.; Cockcroft, D.M.; Ross, P.M.; Calder, R.J. **Pathogenesis of methionine-induced toxicity.** Metab 1970, 19(5):381-91.

Harris, R.A. **Carbohydrate Metabolism I: Major Metabolic Pathways and their Control.** In:

Devlin, T.M. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 4 ed. USA: John Wiley & Sons, Inc, 1997, p267-333.

Heard, C.R.C. **The effects of protein-energy malnutrition on blood glucose homeostasis.** Wld Rev Nutr Diet 1978, 30:107-47.

Heywood, W.E.; Mian, N.; Milla, P.J.; Lindley, K.J. **Programming of defective rat pancreatic beta-cell function in offspring from mothers fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods.** Clin Sci (Lond). 2004, 107(1):37-45.

Hrab, R.V.; Hartman, H.A.; Cox, R.H. Jr.. **Prevention of fluvastatin-induced toxicity, mortality, and cardiac myopathy in pregnant rats by mevalonic acid supplementation.** Teratol 1994, 50:19-26.

Huxley, R.B.; Sheill, A.W.; Law, C.M.. **The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of literature.** J Hipert 2000, 18: 815-31.

Jenness, R. **Biosynthesis and composition of milk.** J. Invest..Dermatol. 1974, 63: 109-118.

Joshi, S.; Garole, V.; Daware, M.; Girigosavi, S. and Rao, S. **Maternal protein restriction before pregnancy affects vital organs of offspring in Wistar rats.** Metabolism 2003, 52(1): 13-8.

Johanson, M.C.; Arizmendi, C.; Medina, J.M. **Permeability and vascularity of the developing brain: cerebellum vs cerebral cortex.** Brain Res 1980, 190:3-16.

Kirsch, R.; Frith, I.; Black, E.; Hoffenberg, R. **Regulation of albumin synthesis and catabolism by alteration of dietary protein.** Nature (London). 1968, 217:578-9.

Langley-Evans, S. **Early life origin of hypertension: a rat model.** In: Ashwell, M. Tomorrow's Nutrition. London: British Nutrition Foundation, 1994, p33-42.

Leclerc, J.; Hamel O.; Grynberg A. **Methionine and threonine supplementation of a protein poor diet during lactation. Effect on diet intake of dam and weight of dam and pup, and on plasma threonine and liver neutral contents of dam.** Nutr Rep Int 1988, 38(8) :635-43.

Levitsky, D.A.; Strupp, B.J. **Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns.** J Nutr 1995, 125:2212S-20S.

Madani, S.; Prost, J.; Belleville, J. **Dietary protein level and origin (casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma lipid transport and antioxidative defense status in the rat.** Nutrition 2000, 16:368-75.

Margolis, R.N.; Curnow, R.T. **Observation on the role of SER in hepatic glycogen** Metab J Cell Biol 1980, 87:203a(Abstract).

Marks, B.D.; Marks, M.D.; Smith, C.M. **Basic medical biochemistry**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997, p655-65.

Marten, N.W.; Sladek, F.M.; Straus, D.S. **Effect of dietary protein restriction on liver transcription factors**. *Biochem J* 1996, 317:361-70.

McGarry, J.D. **Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes**. *Diabetes*. 2002, 51(1):7-18.

Meghelli-Bouchenak, M.; Boquillon, M.; Belleville, J. **Time course of changes in rat serum apolipoproteins during the consumption of different low protein diets followed by a balanced diet**. *J Nutr* 1987, 117(4):641-9.

Mehta, G.; Roach, H.I.; Langley-Evans, S.; Taylor, P.; Reading, I.; Oreffo, R.O.; Aihie-Sayer, A.; Clarke, N.M.; Cooper, C. **Intrauterine exposure to a maternal low protein diet reduces adult bone mass and alters growth plate morphology in rats**. *Calcif Tissue Int* 2002, 71(6):493-8.

Miller, M.; Resnick, O. **Tryptophan availability: The importance of prepartum and postpartum dietary protein on brain indoleamine metabolism in rats**. *Expl Neurol* 1980, 67: 298-314.

Morgan, B.G.L.; Naismith, D.J. **The effect of early postnatal undernutrition on the growth and development of the rat brain**. *Br J Nutr* 1992, 48:15-23.

Morgane, P.J.; Austin-LaFrance, R.J.; Bronzino, J.D.; Tonkiss, J.; Diaz-Cintra, S.; Cintra, L.; Kemper, T.; Galler JR. **Prenatal Malnutrition and development of the brain**. *Neurosci Biobehav Rev* 1993, 17:91-128.

Morgane, P.J.; Mokler, D.J.; Galler, J.R. **Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation**. *Neurosci Biobehav Rev* 2002, 26:471-83.

Muaku, S.M.; Beauloyve, V.; Thissen, J.P.; Underwood, L.E.; Ketelslegers, J.M.; Maiter, D. **Effects of maternal protein malnutrition on fetal growth, plasma IGFs, IGFBPs, and liver insulin-like growth factor gene expression in the rat**. *Pediatr Res* 1995, 37:334-42.

Mueller, A.J.; Cox JR, W.M. **Effect of changes in diet on volume composition of rat milk**. *J Nutr* 1946,31:249-59.

Nassir, F.; Moundras, C.; Bayle, D.; Serougne, C.; Gueux, E.; Rock, E.; Rayssiguier, Y.; Mazur, A. **Effect of selenium deficiency on hepatic lipid and lipoprotein metabolism in the rat**. *Br J Nutr*. 1997, 78(3): 493-500.

Noda, K.; Okita, T. **Fatty liver due to disproportionally added methionine to a low soybean diet and lipotropic action of phosphatides in rats**. *J Nutr* 1980, 110(3):505-12.

Ogawa, A.; Yano, M.; Tsujinaka, T.; Ebisui, C.; Morimoto, T.; Kishibuchi, M.; Morita, J.F.S.; Shiosaki, H.; Monden, M. **Gene expression of albumin and liver-specific nuclear**

transcription factors in liver of protein-deprived rats. J Nutr 1997, 127:1328-32.

Okita, T.; Sugano, M. **Effects of dietary protein levels and cholesterol on tissue lipids of rats.** J Nutr Sci Vitaminol. 1990,36 Suppl 2:S151-6.

Okitolonda, W.; Brichard, S.M.; Henquin, J.C. **Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat.** Diabetologia 1987, 31:946-51.

Ozanne, S.E.; Wang, C.L.; Petry, C.J.; Smith, J.M.; Hales, C.N. **Ketosis resistance in the male offspring of protein-malnourished rat dams.** Metabolism 1998, 47(12):1450-4.

Park, H.K.; Jin, C.J.; Cho, Y.M.; Park, D.J.; Shin, C.S.; Park, K.S.; Kim, S.Y.; Cho, B.Y.; Lee, H.K. **Changes of mitochondrial DNA Content in the male offspring of protein-malnourished rats.** Ann N.Y. Acad Sci 2004, 1011:205-6.

Park, K.S.; Kim, S.K.; Kim, M.S.; Cho, E.Y.; Lee, H.J.; Lee, K.; Pak, Y.K. and Lee, H.K. **Fetal and Early Postnatal Protein Malnutrition Cause Long-Term Changes in Rat Liver and Muscle Mitochondria.** J. Nutr. 2003, 133:3085-90.

Ramón y Cajal, S. **Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.** Madrid: Institute Ramon y Cajal, 1911, p80-106.

Rao, S.; Girigosavi, S.; Daware, M.; Garole, V.; Joshi, S. **Maternal protein restriction before pregnancy affects vital organs of offspring in Wistar rats.** Metabolism 2003, 52:13-8.

Rees, W.D.; Hay, S.M.; Brown, D.S.; Antipatis, C.; Palmer, R.M. **Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in the livers of rat fetuses.** J. Nutr 2000, 130: 1821-6.

Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. Jr. **AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76-A rodent diet.** J Nutr 1993, 123: 1939-51.

Rotta, L.N.; Schmidt, A.P.; Mello e Souza, T.; Nogueira, C.W.; Souza, K.B.; Izquierdo, I.A.; Perry, M.L.S.; Souza, D.O. **Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain.** Neurochem Res 2003, 28(8):1181-6.

Schweigert, I. **Efeitos de diferentes tipos de proteínas na dieta com ou sem suplementação de L-metionina no metabolismo lipídico de ratas.** Dissertação para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas-Bioquímica UFRGS, 1998, 36-39.

Schweigert, I.D.; Roehrig, C.; da Costa, F.; Scheibel, F.; Gottfried, C.J.S.; Rotta, L.N.; Gonçalves, C.A.; Souza, D.O.; Perry, M.L.S. **High extracellular K⁺ levels stimulate acetate oxidation in brain slices from well and malnourished rats.** Neurochem Res 2004, 29: 1539-43.

Shambaugh, G.E. 3rd. **Ketone body metabolism in the mother and fetus.** Fed Proc. 1985, 44(7):2347-51. Review.

- Shaw, H.M.; Huang, C.J. **Secretion of alpha-tocopherol in VLDL is decreased by dietary protein insufficiency in young growing rats.** J Nutr 2000, 130(12):3050-4.
- Shepherd, J. **The role of the exogenous pathway in hypercholesterolemia.** European Heart Journal Supplements 2001, 3: E2-E5.
- Simons, K.; Ikonen, E. **How cells handle cholesterol.** Science 2000, 290:1721-6.
- Smart, J.L. **Symposium on behavioral consequences of undernutrition.** Proc Nutr Soc 1993, 52:198-199.
- Souza, K.B.; Feoli, A.M.; Krüger, A.H.; Souza, M.R.; Rotta L.N.; Souza, D.O., Perry M.L.S. **Effects of Undernutrition on Glycine Metabolism in the Cerebellum of Rats.** Ann Nutr Metab 2004,48:246-50.
- Szitanyi, P.; Hanzlova, J.; Poledne, R. **Influence of intrauterine undernutrition on the development of hypercholesterolemia in an animal model.** Physiol Res.2000,49(6):721-4.
- Sykes, S.E.; Cheyne, J.A. **The effect of prenatal and posnatal protein malnutrition on phisical and mothor development of the rat.** Dev Psychobiol 1976, 9:285-95.
- Timofeeva, N.M.; Gordova, L.A.; Egorova, V.V.; Nikitina, A.A.; Iezuitova, N.N. **Delayed effects of protein deficiency in nutrition of the pregnant rats on development of the enzymatic system in digestive and nondigestive organs of offspring.** Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova 2002, 88(8):1028-35.
- Torún, B.; Chew, F. **Protein-energy malnutrition.** In: Shils, M. E.; Olson, J.A. & Shike, M. Modern Nutrition in Health and Disease. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994 vol. 2, p950-76.
- Tovar, A.R.; Santos, A.; Halhali, A.; Bourges, H.; Torres, N. **Hepatic histidase gene expression responds to protein rehabilitation in undernourished growing rats.** J Nutr 1998, 128:1631-35.
- Troen, A.M.; Lutgens, E.; Smith, D.E.; Rosenberg, I.H. and Selhub, J. **The atherogenic effect of excess methionine intake.** PNAS 2003, 100(25):15089–94.
- Vitiello, F.; Legrand, J.; Cioffi, L.; Gombos, G. **Comparison of effect of early undernutrition imposed by two different methods on rat cerebellar development.** Biochem Soc Trans 1985, 13: 759-60.
- Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre: Artmed, 2000, p220-78.
- Vonnahme, K.A.; Hess, B.W.; Hansen, T.R.; McCormick, R.J.; Rule, D.C.; Moss, G.E.; Murdoch. W.J.; Nijland, M.J.; Skinner, D.C.; Nathanielsz, P.W.; Ford, S.P. **Maternal undernutrition from early- to mid-gestation leads to growth retardation, cardiac ventricular hypertrophy, and increased liver weight in the fetal sheep.** Biol Reprod 2003, 69(1):133-40.

Winick, M. **Nutrition and nerve cell growth.** Federation Proceedings 1970, 29:1510-5.

Woodall, S.M.; Breier, B.H.; Johnston, B.M.; Bassett, N.S.; Barnard, R.; Gluckman, PD. **Administration of growth hormone or IGF-I to pregnant rats on a reduced diet throughout pregnancy does not prevent fetal intrauterine growth retardation and elevated blood pressure in adult offspring.** J Endocrinol 1999, 163(1):69-77.

Wouters, M.G.A.J.; Thomas, C.M.G.; Boers, G.H.J.; Borm, G.F.; Blom, H.J.; Steegers-Theunisen, R.P.M.; Trijbels, F.J.M.; Eskes, T.K.A.B. **Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss.** Fertil. Steril. 1993, 60:820-25.

Zamanhof, S.; Van Marthens, E.; Margolis, F. **DNA (cell number) and protein in neonatal brain: Alterations by maternal dietary protein restriction.** Science 1968; 160:322-3.

VI - ANEXOS

Guide for Authors

Clinical Nutrition aims to publish relevant scientific advances in the pathogenesis, diagnosis and management of nutritional and metabolic disorders both in acute and chronic diseases.

Each issue combines basic and clinical research in a balanced fashion.

Clinical Nutrition publishes original articles, short reports (including case reports) and letters to the editor. Review articles are usually invited, but non-solicited reviews of exceptional merit can also be accepted.

Address for Contributors

All manuscripts and correspondence should be submitted to:

Editor-in-Chief
Miquel A Gassull, MD,
Department of Gastroenterology
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
Carretera del Canyet s/n
E-08916 Badalona (Barcelona)
Spain

Form of Manuscripts

Three copies (an original and two clear photocopies) of each manuscript must be submitted, in A4, double-spaced, typewritten form with a margin of at least 2.5 cm (1 inch) on all sides.

For full-length research articles, the manuscripts should be organized in the following sequence: Title Page, Abstract, Introduction Materials and Methods (including statistical and ethical considerations), Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, and Figure Legends. Pages should be numbered in succession in the upper right-hand corner; beginning in the title page. Manuscripts should be carefully prepared to avoid duplication of data in the text, tables and figures.

Only previously unpublished work should be submitted; all text, including requested material, will be subject to editorial review and revision. Only manuscripts in English will be accepted. (Manuscripts accepted for publication will not be returned to authors. Those manuscripts not suitable for publication in the journal will be returned.) The manuscripts become the property of *Clinical Nutrition* and may not be published elsewhere without

written permission from the publisher.

Specific Instructions for Letters to the Editor

Letters to the Editor are considered for publication provided they do not contain material that has been submitted or published elsewhere.

Full address, phone and fax number, and e-mail should be included.

The text, not including references, must not exceed 450 words.

The letter must have no more than five references and one figure or small table. It should not be signed by more than three authors. When a letter refers to an article recently published in *Clinical Nutrition*, the opportunity for reply will be given to the authors. Such a reply will be published along with the letter.

Manuscripts may be submitted to:

Miquel A Gassull
Dept of Gastroenterology
Hosp. Universitari Germans Trias I Pujol
Carretera del Canyet s/n
Barcelona 08916
Spain
Tel: +34 93 497 8951
Fax: +34 93 497 8951
E-mail: mgassull@ns.hugtip.scs.es

Title

The title page must include the following elements:

Title. It should be brief and specific and must not include abbreviations.

Authors. Include first name of the author(s) and name of the institution(s) where the work was performed. Omit degrees of the authors. Provide contact details for all authors.

Short title. A short title (no more than 50 characters) for the purposes of running head must be provided.

Address for correspondence. Give the name, complete address, telephone and fax numbers, and E-mail address of the corresponding author (to whom requests for reprints should be addressed).

Abstracts

This should be typed, double-spaced on a separate page and must not exceed 200 words. The abstract must be organized to the following headings: Background & Aims, Methods, Results, and Conclusions. No abbreviations should be used in the abstract.

Reference Format

References have to be cited in the text by Arabic numerals in parentheses, and numbered in the order in which they are cited. The reference section should be typed double-spaced at the end of the text, following the sample format given below.

Abbreviate journal titles according to the List of Journals Indexed in Index Medicus (available from the Superintendent of Documents, US Government Printing Office, Washington, D.C. 20402, USA, DHEW Publication No. (NIH) 91-267; ISSN 0093-3821. Provide all authors' names. Provide article titles and inclusive pages. 'Unpublished data' and 'personal communications' do not qualify as References and should be placed in parentheses in the text. Accuracy of reference data is the responsibility of the author.

Sample References

Article in a journal:

1. Cummings J H, MacFarlane G T. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. Clin Nutr 1997; 16: 3-11.

Book:

1. McLaren D S, Meguid M M. Nutrition and its disorders, 4th edn. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988.

Chapter in a book:

1. Goodwin S C, Liu S. Radiologic techniques for enteral access. In: Rombeau J L, Rolandelli R H, Eds. Enteral and tube feeding, 3rd edn. Philadelphia: W B Saunders, 1997: 193-206.

Figures

Figures should not be smaller than 127 '73 mm (5 ' 7 inches) or larger than 203 ' 254 mm (8 ' 10 inches). Photographs, photomicrographs, electron micrographs, roentgenograms, and drawings should be submitted as black-and-white high-quality glossy prints. On the back of each figure, lightly write in pencil the figure number (in Arabic numerals), an indication of the top edge, and the last name of the senior author. Drawings should be professionally drawn. While output from a laser printer is acceptable, output from a plotter or typewriter lettering is not acceptable.

Submit only one set of glossy prints, and attach full-page photocopies of the figures to each copy of the manuscript.

Figure legends

Legends should be typed double-spaced in consecutive order on a separate sheet. They should be brief and provide enough information to permit interpretation of figures without reference to text.

Tables

Tables should be typed double-spaced, each on a separate sheet, and contain only horizontal rules. The tables should be numbered in Arabic numerals and contain a brief specific title. Data presented in tables must be logically and clearly organized; they should be self-explanatory and should supplement, not duplicate the text.

Keywords

List descriptive key words (no more than six) for indexing purposes.

Acknowledgements

Acknowledgements to individuals or institutions, including grants and sources of funding, should be listed in the Acknowledgements section at the end of the text just before the list of references.

Units & Abbreviations

Body of the Paper

Headings should be appropriate to the nature of the paper and enhance readability. Usually, only two categories of heading should be used. Abbreviations may be used when the term is used at least three times in the text, but the full term for which an abbreviation stands should precede its first use unless it is a standard unit of measurement. Abbreviations used only in a table or figure may be defined in the legend. Identify drugs and chemicals used by generic name (if trademarks are mentioned, manufacturer name and city should be given). The metric system should be used for all measurements (weight, length, etc.). Temperatures should be expressed as Celsius (centigrade). Metric abbreviations should be expressed in lower case without periods and with no distinction between singular and plural. Both SI and traditional units may be used.

Disk/Electronic Submission

Submission of the final version of articles in electronic form, along with the traditional paper version, is encouraged. Please see the guidelines for submission of manuscripts on disk, published along with these instructions in every issue of the journal.

Copyright Information

In order to ensure maximum dissemination and copyright protection of material published, all submissions must include a copyright transfer agreement (CTA) signed by the senior author. Contributors may use photocopies of the CTA form which is published in every issue of *Clinical Nutrition*. No paper will be published without the corresponding CTA.

Permissions Information

If a figure or table has previously appeared in copyright material, the author must obtain written permission from the copyright holder (usually the publisher of the original work) to reprint it. Full credit to the original publication must be included in the legend of the figure or footnote to the table. Enclose all letters granting permission at the time of submission of the manuscript.

The author is responsible for payment of applicable fees for reprinting previously published material.

The use of identifiable patient photographs requires written release from the patient (or guardian) to do so. Obtaining this release is the author's responsibility, and a copy of such must accompany the manuscript at the time of submission. In cases where consent has not been obtained and recognizable features may appear, it will be necessary to retouch the illustration to mask out the eyes or otherwise render the individual 'officially unrecognizable'.

Proofs

The correspondence author will be supplied with page proofs to check accuracy of printing. Authors may be charged for any alterations to the proofs beyond those needed to correct typesetting errors. Proofs must be checked carefully and returned by e-mail, fax or post to the issue manager at Elsevier Science Ltd within 48 h of receipt.

Offprints

Twenty-five free offprints are supplied to the correspondence author. An offprint order form will be sent to the author with the proofs.