UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada
atenua em proles os efeitos mediados pela dieta
materna restrita em proteína**

Gabriela Fullin Resende Teodoro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE.

Orientador:

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada
atenua em proles os efeitos mediados pela dieta
materna restrita em proteína**

Gabriela Fullin Resende Teodoro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2010

Gabriela Fullin Resende Teodoro

**Suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada
atenua em proles os efeitos mediados pela dieta
materna restrita em proteína**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2010.

"O valor de todo o conhecimento está no seu vínculo com as nossas necessidades, aspirações e ações; de outra forma, o conhecimento torna-se um simples lastro de memória, capaz apenas - como um navio que navega com demasiado peso - de diminuir a oscilação da vida cotidiana."

(V. O. Kliutchevski)

Dedico aos meus amados pais Pedro Teodoro Rodrigues de Resende e Neire Aparecida Fullin e queridos irmãos, Pedro Teodoro Rodrigues de Resende Filho e Gustavo Fullin Resende Teodoro, os quais me ensinaram que “a alma mais forte e mais bem constituída é aquela que os sucessos não orgulham e que não se abate com os revezes”.

(Plutarco)

AGRADECIMENTOS

"Agradeço imensamente sem esquecer o oportuno e benquisto gesto, o favor, o préstimo - a tábua de salvação me atirada. Não ousando discutir a qualidade da madeira daquela, gostaria, contudo de não me sentir devedor de um barco inteiro quando me insinuam a lembrança". (Luis Batarda G.)

Início desta forma, agradecendo a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e que por ventura, seus nomes não estejam aqui referendados.

Agradeço a **Deus**, pela oportunidade de realizar mais uma conquista, pelas vicissitudes vivenciadas, e, sobretudo pela força ao longo desta difícil jornada.

A meus pais e irmãos, pilares da minha sustentação, pelo incentivo, educação, apoio e pelas palavras de conforto, prestados sempre que necessário.

Ao amigo e orientador **Professor Julio Tirapegui**, pelo acolhimento, contribuição intelectual, confiança e auxílio proporcionado para a concretização deste trabalho e aperfeiçoamento profissional. Dos seus ensinamentos ficarão, sobremaneira, que o aprimoramento da instituição acadêmica, deve-se sobrepor aos conflitos de interesse e que é preciso coragem para fazê-lo florescer.

Ao amigo **José Donato Júnior**, pesquisador nato, pelos conselhos, motivação, discussões, críticas e conhecimento compartilhado. Pessoa pela qual tenho imensa gratidão e admiração, responsável pela minha paixão relacionada ao objeto de estudo- programação fetal, com quem aprendi que ser um bom pesquisador exige esforços desmedidos, os quais, todavia, serão em algum momento recompensados. Sua ajuda e suas sábias palavras foram essenciais para o enriquecimento da presente pesquisa.

A amiga **Ivanir Santana de Oliveira Pires**, técnica do laboratório, que foi primordial nesta minha trajetória, com quem aprendi a maior parte das análises e sobre como funciona um laboratório de pesquisa. Agradeço pelo conhecimento técnico compartilhado, pelo auxílio nas análises e eutanásias, pelo apreço e carinho cultuado. Sua participação foi decisiva para o cumprimento desta árdua tarefa.

Aos amigos e colegas de laboratório, especialmente **Francisco Leonardo, Daiana Vianna, Lucas Pantaleão, Emídio Matos, Michele Trindade, Tatyana de Paula e Éder Petry**, minha família adotiva, pela qual cultivo imenso carinho, apreço, respeito e eterno agradecimento, que contribuiu de forma significativa não somente para a conclusão da pesquisa, mas também à minha adaptação à cidade e crescimento pessoal. Vocês são exemplos de caráter, força e garra. Não tenho palavras para descrever o que cada um representa em minha vida, porém sei que todos sabem da extrema relevância que tiveram ao longo deste período. A todos o meu sincero agradecimento.

Ao amigo **Lucas Carminatti Pantaleão**, que cooperou intensamente para que este trabalho pudesse ser concluído, não medindo esforços para auxiliar-me. Alguém que esteve ao meu lado em momentos difíceis e de descontração, ensinando muito além de teorias. Obrigada pela amizade, paciência, pela ajuda nos finais de semana, feriados e férias. Espero que Deus possa recompensá-lo e que em breve eu esteja aplaudindo todas as suas merecidas conquistas.

Aos amigos **Francisco Leonardo e Emídio**, pelos socorros prestados, por sempre estarem disponíveis nos momentos que precisei, pelo apoio e ajuda em questões acadêmicas ou não acadêmicas, pelos almoços de domingo. “As vezes em certos momentos difíceis da vida, em que precisamos de alguém para ajudar na saída, suas palavras de força, de fé e de carinho, me deram a certeza de que eu nunca estive sozinha. Vocês que me disseram as verdades com frases abertas, amigos vocês foram os mais certos das horas incertas”. Serei eternamente grata a vocês.

A amiga **Daiana Vianna**, que acompanhou todo o processo deste longo trabalho. Estudamos juntas para prestar o processo seletivo, estivemos ao lado da outra em todas as dificuldades, porém também em bons momentos que ficarão em nossas lembranças. Não tenho como descrever a imensa gratidão e carinho que cultivo por ti. Esteja sempre em paz e saiba que se precisar é só gritar.

Aos **amigos dos demais laboratórios do departamento de Alimentos e Nutrição Experimental e Farmácia da FCF/USP**, destacando Viviane, Felipe, Lucília, Milessa e Eleofábia pelos momentos de descontração.

A querida amiga-irmã **Maria Betânia Bessa Florêncio** pela torcida, apoio moral e amizade ao longo de todos estes anos.

A todos os **funcionários do departamento de Alimentos e Nutrição Experimental**, especialmente aos funcionários da secretária **Edilson, Cleonice e Mônica**, pelos esclarecimentos e atenção prestados quando necessário.

Aos funcionários do biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, sobretudo à **Flávia e Renata**, pela ajuda, solicitude e esclarecimentos.

Aos professores das disciplinas que cursei durante o mestrado.

Aos professores que participaram da banca de qualificação e de defesa e também àqueles que gentilmente me ajudaram quando foi preciso.

À **Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda**, pelo fornecimento dos aminoácidos leucina, valina, isoleucina, treonina, tirosina e lisina, utilizados no preparo das rações do presente trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ**, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos, o meu imensurável agradecimento e a certeza de que independente da frequência que nos encontremos, terei a mais sublime das lembranças por tudo que foi vivenciado.

TEODORO, G.F.R. **Suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada atenua em proles os efeitos mediados pela dieta materna restrita em proteína.** São Paulo, 2010. [Defesa de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

RESUMO

Estudos em animais mostram que a desnutrição proteica intrauterina pode acarretar redistribuição do fluxo sanguíneo intraútero, podendo promover modificações permanentes na estrutura e funcionalidade de alguns órgãos, o que ocasiona modificações no metabolismo. Além disso, a desnutrição intrauterina pode afetar a secreção de hormônios que atuam no crescimento fetal, podendo conduzir à restrição do crescimento intrauterino. Esse fenômeno pode parcialmente ser explicado pela hipótese da programação fetal, na qual é sugerido que ocorra uma adaptação metabólica e fisiológica do feto a uma condição intrauterina adversa, que pode induzir o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta. Neste contexto, pesquisas com suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) têm verificado a capacidade desses nutrientes promoverem a síntese proteica mesmo em condições catabólicas, por meio da ativação de uma via bioquímica intracelular intercedida pela proteína quinase Alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR), a qual está envolvida no estímulo à etapa de tradução proteica. Assim, o presente trabalho avaliou o efeito da suplementação de BCAA em proles submetidas à desnutrição proteica materna. Para tanto, ratas *Wistar* foram acasaladas com ratos adultos de mesma raça. Uma vez constatada a gravidez, as matrizes foram distribuídas em grupos de acordo com a dieta que seria fornecida no decorrer da gestação: CON (20% proteína); VAL/ISO (5% proteína + 2% VAL + 2% ISO); AAE (5% proteína + 4% AAE); e BCAA (5% proteína + 4% BCAA). O protocolo de restrição proteica materna adotado causou redução no crescimento corporal e na massa de órgãos das proles. Embora a suplementação com VAL/ISO e AAE não tenha recuperado os efeitos mediados pela deficiência de proteína, foi constatado que a suplementação com BCAA reverteu parte do déficit observado no crescimento das proles, uma vez que foi eficaz em minimizar ou mesmo em restaurar plenamente diversos parâmetros como peso de órgãos, massa de gordura da carcaça e parâmetros indicativos do estado nutricional proteico, como as concentrações de proteína e RNA hepáticas e musculares. Estes efeitos podem parcialmente ser explicados pelo estímulo induzido pela suplementação com BCAA, na via de sinalização da mTOR, considerando que foi verificado no fígado das proles de matrizes que receberam esta suplementação, aumento na fosforilação desta proteína ($P < 0,05$), a qual é responsável por desencadear uma cascata de eventos biomoleculares que culminam, em última instância, no acréscimo da síntese proteica. Diante disto, torna-se relevante a realização de pesquisas que avaliem em longo prazo, os efeitos da suplementação com BCAA em proles submetidas à dieta materna restrita em proteína.

Palavras-chave: Aminoácidos de cadeia ramificada. mTOR. Síntese Proteica. Dieta restrita em proteína. Gravidez. Desenvolvimento fetal.

TEODORO, G.F.R. **Branched-chain amino acids supplementation attenuates in offspring the effects mediated by maternal protein-restrict diet.** São Paulo, 2010. [Master's degree dissertation - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo].

ABSTRACT

Animal studies show that intrauterine malnutrition may cause redistribution of blood flow in uterus, which may promote permanent changes in structure and function of some organs, which causes changes in metabolism. Furthermore, intrauterine malnutrition can affect the secretion of hormones that act on fetal growth and may lead to intrauterine growth restriction. This phenomenon can partly be explained by the hypothesis of fetal programming, which is suggested that occur a metabolic and physiological adaptation of the fetus to an adverse intrauterine condition, which can induce the development of chronic diseases in later life. In this context, researches with supplementation of branched chain amino acids (BCAA), especially leucine, have verified the ability of these nutrients to promote protein synthesis in catabolic conditions, through the activation of an intracellular biochemical pathway interceded by protein kinase Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), which is involved in the stimulating of protein translation stage. Thus, this study evaluated the effect of BCAA supplementation in offspring subjected to maternal protein-restrict diet. To this, Wistar rats were mated with adult rats of the same race. Once was confirmed the pregnancy, the pregnant rats were distributed into groups according to the diet that would be provided during pregnancy: CON (20% protein); VAL/ISO (5% protein + 2% + 2% VAL/ISO), AAE (5% protein + 4% EAA) and BCAA (5% protein + 4% BCAA). The protocol adopted maternal protein restriction caused a reduction in body growth and weight of the offspring's organs. Although supplementation with VAL/ISO and AAE has not recovered the effects mediated by protein deficiency, it was found that supplementation with BCAA has reversed part of the deficit observed in the growth of the offspring, since it was effective in minimizing or even fully restoring various parameters such as organ weight, carcass fat mass and parameters indicative of nutritional protein, such as the concentrations of protein and RNA in liver and muscle. These effects may be partially explained by the stimulation induced by BCAA supplementation on the mTOR signaling pathway, considering that was verified in the liver of the offspring from dams that received this supplementation augment on the phosphorylation of this protein ($P < 0,05$), which is responsible for triggering a cascade of molecular events that culminate, ultimately, in increased protein synthesis. Given this, it becomes relevant to conducting research to assess long-term effects of supplementation with BCAA in offspring subjected to maternal protein-restricted diet.

Keywords: Branched-chain amino acids. mTOR. Protein synthesis. Protein-restrict diet. Pregnancy. Fetal development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Regulação da via da mTOR pela leucina.....	5
Figura 2: Desenho Experimental.....	12
Figura 3: Peso corporal inicial e final, e Ganho de Peso Gestacional (GPG)..	34
Figura 4: Concentrações séricas de albumina e proteína das matrizes.....	38
Figura 5: Pesos absolutos dos filhotes e de órgãos.....	39
Figura 6: Composição química da carcaça .	39
Figura 7: Concentração de albumina sérica de filhotes.....	40
Figura 8: Concentração de proteína e RNA no fígado e músculo dos filhotes.....	41
Figura 9: Quantificação da expressão total das proteínas mTOR, S6k1 e 4EBP-1 e de suas respectivas fosforilações em Ser ₂₄₄₈ , Thr ₃₈₉ , e Thr ₇₀ ,.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das rações utilizadas.	14
Tabela 2: Aminograma das rações.....	15
Tabela 3: Composição centesimal das rações	3516
Tabela 4: Consumo médio diário de ração, macronutrientes e calorias	36
Tabela 5: Número de filhotes ao nascer por grupo.	36

LISTA DE ABREVIações

AAE	Grupo suplementado com aminoácidos essenciais
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada/grupo suplementado com BCAA
COM	Grupo controle
DCRR	Complexo desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada
eIFs	Fatores de iniciação eucarióticos
eIF4E	Fator de iniciação eucariótico 4E
eIF4G	Fator de iniciação eucariótico 4G
GPG	Ganho de peso gestacional
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
S6K1	Proteína ribossomal S6 quinase-1 de 70 kDa
RNA	Ácido ribonucléico
RCIU	Restrição do crescimento intrauterino
S6K1	Proteína ribossomal S6 quinase-1 de 70 KDa
SN	Sensor nutricional
VAL/ISO	Grupo suplementado com valina e isoleucina
4E-BP1	Proteína ligadora 1 do fator de iniciação eucariótico

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
2.JUSTIFICATIVA.....	8
3. OBJETIVO GERAL.....	9
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1 Animais.....	10
4.2 Desenho Experimental	10
4.3 Dieta.....	13
4.4 Determinação do peso corporal e do consumo de ração das matrizes ...	16
4.5 Eutanásia dos animais e coleta das amostras	16
4.6 Composição química da carcaça	18
4.7 Parâmetros teciduais.....	28
4.7.1 Extração de proteína e RNA do fígado e do músculo gastrocnêmio	28
4.7.2 Concentração da proteína muscular e hepática	28
4.7.3 Concentração do RNA muscular e hepático	29
4.8 Parâmetros séricos	29
4.8.1 Concentração de proteínas totais no soro	29
4.8.2 Concentração da albumina sérica	30
4.9 Parâmetros moleculares.....	30
4.9.1. Western Blotting	30
4.10. Análise estatística	33
5.RESULTADOS.....	34
5.1 Peso corporal inicial e final, e ganho de peso gestacional (GPG).....	34
5.2 Consumo da ração	35
5.3 Número de filhotes no nascimento	36
5.4 Parâmetros séricos matrizes	36
5.5 Massa corporal e de órgãos dos filhotes	37
5.6 Composição química da carcaça	39
6. Parâmetros indicativos do estado nutricional proteico	40
6.1 Concentração de RNA e de proteína no fígado e no músculo gastrocnêmio	40
6.2 Concentração de albumina sérica	41
7. Via de sinalização da mTOR.....	41
6.DISSCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÃO	52
8.REFERÊNCIAS	53
ANEXOS.....	61

1. INTRODUÇÃO

No decorrer da gestação, o crescimento e desenvolvimento do feto, processos complexos e dinâmicos, e suas necessidades nutricionais são inteiramente dependentes da nutrição materna. Assim, não é surpreendente que variações na dieta das mães neste período possam refletir em alterações na saúde fetal, provocadas pela adaptação do feto ao ambiente intrauterino adverso (McARDLE *et al.*, 2006). Essas alterações são de origem fisiológica e metabólica, e podem levar a distúrbios na vida adulta que culminam no aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis (BARKER, 1997).

Nesse sentido, estudos epidemiológicos que correlacionam o baixo peso ao nascer a distúrbios metabólicos demonstram as consequências da má nutrição materna no desenvolvimento de desordens na vida adulta, tais como: obesidade (RAVELLI *et al.*, 1976), doenças cardiovasculares com incidência aumentada de infarto (RICH-EDWARDS *et al.*, 1997), resistência à insulina e diabetes (FALL *et al.*, 1995), pressão sanguínea elevada (HOLLAND *et al.*, 1993; FALL *et al.*, 1995) e dislipidemias, como elevada concentração de triglicérides e redução das lipoproteínas de alta densidade (HDLc) (FALL *et al.*, 1995).

Baseado nessas observações, Barker (1997) desenvolveu a hipótese da origem fetal de doenças, ao propor que fetos expostos a um suprimento limitado de nutrientes adaptam-se a esta situação alterando seus processos metabólicos. A programação fetal pode, assim, ser definida como um processo adaptativo a um ambiente adverso intrauterino que resulta na redefinição nos processos de desenvolvimento, garantindo a sobrevivência fetal (VICKERS, 2001).

Nessa direção, tem-se observado que modificações na dieta durante a gravidez, como a restrição de proteína, promovem variações específicas na atividade funcional e na expressão de transportadores placentários, sobretudo de transportadores de aminoácidos, que podem contribuir diretamente na regulação do crescimento fetal em resposta à oferta alterada de nutrientes pela placenta (JANSSON & POWELL, 2006).

Partindo desta premissa, alguns estudos em animais mostram que a desnutrição intrauterina pode acarretar redistribuição do fluxo sanguíneo intraútero, acompanhando mecanismos metabólicos compensatórios para proteger tecidos vitais, especialmente o cérebro (FALL *et al.*, 2003). Essa

proteção causa redução no crescimento de alguns órgãos, como fígado e pâncreas, podendo promover modificações permanentes de suas estruturas o que, em última instância, acarreta modificações em suas funções (DESAI *et al.*, 2005). Além disso, a desnutrição intrauterina pode afetar a imunocompetência (LANDGRAF *et al.*, 2005), a composição corporal e a secreção de hormônios que atuam, sobretudo, no crescimento fetal (DESAI *et al.*, 2005; FALL *et al.*, 2003), podendo conduzir à restrição do crescimento intrauterino (RCIU) (DESAI *et al.*, 2005).

Vários modelos experimentais têm sido utilizados a fim de induzir a RCIU e avaliar suas consequências em diferentes sistemas (HUIZINGA *et al.*, 2004), sendo o modelo de dieta materna pobre em proteína um dos mais extensamente estudados (OZANNE & HALLES, 1999). A aplicação deste modelo em ratos envolve o consumo de uma dieta restrita em proteína (5-10%) durante a gravidez (DESAI *et al.*, 1996).

Nesse sentido, algumas pesquisas que avaliaram o efeito da desnutrição proteica materna verificaram que proles de ratas alimentadas no decorrer da gestação com dieta deficiente em proteína, além de serem menores e mais leves do que as de fêmeas alimentadas com dieta normoproteica, também apresentaram alterações na estrutura e no funcionamento de seus órgãos acarretando em reduzida tolerância à glicose e hipertensão na vida adulta (LANGLEY-EVANS *et al.*, 1996; DESAI *et al.*, 1996). Em um estudo conduzido por Rees *et al.* (1999) constatou-se diferença significativa no peso fetal, placentar e de órgãos (fígado, rins, coração e cérebro) nas crias de fêmeas que sofreram restrição proteica ao longo da gravidez.

Outros estudos ainda dão suporte à teoria de que a desnutrição materna pode programar o metabolismo do tecido adiposo levando à posterior obesidade (BUDGE *et al.*, 2005; TAYLOR & POSTON, 2007). Estudos conduzidos por Ozanne *et al.* (2004) e por Zambrano *et al.* (2006) evidenciaram que uma restrição proteica no período gestacional (redução de 50% no consumo de proteínas) aumenta a suscetibilidade em desenvolver obesidade na vida adulta em proles de ratos e camundongos.

Embora se conheçam os efeitos desta modulação dietética no feto, ainda não estão totalmente esclarecidos os mecanismos pelos quais a restrição proteica afeta o crescimento fetal. Já se sabe que as células embrionárias são

capazes de responder diretamente à deficiência de aminoácidos por alterar a expressão de uma variedade de genes que regulam o crescimento, a diferenciação e a apoptose (FLEMING *et al.*, 1998).

Aparentemente, esta habilidade associada ao papel central dos aminoácidos no metabolismo do feto e da placenta, sugere que pode haver uma interação direta entre o suprimento de aminoácidos e o crescimento fetal. O metabolismo proteico em ratos durante o crescimento fetal subdivide-se em duas fases. Inicialmente, nas duas primeiras semanas, é caracterizado por uma fase anabólica em que há acréscimo no conteúdo de proteína corporal materno e insignificante mobilização deste estoque de proteína para o feto. A fim de suprir o rápido crescimento fetal, no decorrer da segunda fase, que ocorre na terceira semana de gestação, as reservas de proteínas são utilizadas (NAISMITH *et al.*, 1976; REMESAR *et al.*, 1987). Contudo, não está evidenciado se este mecanismo pode compensar o consumo reduzido de proteína e manter o fornecimento de aminoácidos livres para o feto.

A maioria dos estudos envolvendo a utilização de modelo com dieta materna restrita em proteína tem focado os seus resultados sobre o crescimento fetal e suas consequências em longo prazo, entretanto os mecanismos sinalizatórios de transporte de nutrientes, alterados pela nutrição materna no feto, não estão bem estabelecidos. Poucas pesquisas avaliaram a implicação do transporte placentário de nutrientes alterado em resposta à desnutrição proteica (GAZZOLA *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2006).

Partindo dessa premissa, Malandro *et al.* (1996), mostraram que ratas submetidas à desnutrição proteica ao longo da gestação apresentam redução significativa da atividade de transportadores placentários específicos para aminoácidos (Sistema A), o que poderia prejudicar o crescimento e desenvolvimento fetal.

Recentemente uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no fornecimento de aminoácidos pela placenta no metabolismo fetal, permitiu definir que os aminoácidos atuam como reguladores do desenvolvimento fetal e placentário, por influenciar vias metabólicas entre a placenta e o feto. Estes também atuam diretamente na regulação da síntese proteica em vários tecidos do feto e da placenta por regular a atividade e/ou a expressão de proteínas envolvidas na tradução proteica (REGNAULT *et al.*, 2005).

A função primária dos aminoácidos, como substratos diretos para síntese proteica, é evidente, por outro lado, ainda não está bem estabelecida se a maior oferta de proteína em condições catabólicas, como envelhecimento, câncer e desnutrição, também pode estimular processos anabólicos, mediante a ativação de vias específicas de sinalização (KIMBALL e JEFFERSON, 2006).

Alguns pesquisadores demonstraram que este estímulo é dependente, principalmente, dos aminoácidos de cadeia ramificada (*Branched-Chain Amino Acids- BCAA*), que são constituídos pela leucina, valina e isoleucina (GARLICK e GRANT, 1988). Dentre estes, o aminoácido leucina, em especial, destaca-se por estimular a síntese proteica no músculo esquelético (BUSE e REID, 1975; LI e JEFFERSON, 1978; ANTHONY *et al.*, 2000a,b) e em outros tecidos (LYNCH, 2002).

De acordo com as evidências experimentais recentes, tem sido demonstrado que a leucina modula a iniciação do processo de tradução proteica, o qual é fundamental no controle da síntese de proteínas realizado pela célula (GARLICK, 2005; KIMBALL e JEFFERSON, 2006). Esta modulação ocorre por meio da fosforilação e consequente ativação da proteína quinase Alvo da Rapamicina em Mamíferos (*Mammalian Target of Rapamycin - mTOR*). Esta proteína é considerada um sensor celular de nutrientes, ou sensor nutricional (SN), capaz de integrar fatores ambientais com a capacidade de sobrevivência do organismo (KIMBALL e JEFFERSON, 2004). O termo SN tem sido interpretado e definido de diferentes maneiras. De forma objetiva, um SN é uma proteína cuja ligação a um determinado nutriente conduz a uma mudança na sua função que, em alguns casos, podem ativar alvos *downstream*, ou seja, proteínas quinases que podem ser sinalizadas abaixo de um determinado alvo de sua cascata de sinalização.

Já é reconhecido, que a mTOR é estimulada na presença de mitógenos como a insulina e alguns nutrientes, especialmente a leucina (ANTHONY *et al.*, 2002). Assim, quando os estoques de aminoácidos, em particular de leucina, estão aumentados, a mTOR forma um complexo com outras proteínas a fim de fosforilar componentes chave do complexo que traduzem o ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) em proteínas.

A mTOR atua na via de sinalização que regula o crescimento celular e a síntese proteica. Neste processo, a mTOR fosforila a proteína 1 ligadora do

fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1), inibindo-a, o que leva à dissociação do complexo 4E-BP1. O resultado é o favorecimento da formação do fator de iniciação eucariótico-4E (eIF4E), essencial à iniciação do processo de tradução (STIPANUK, 2007).

A leucina também estimula um segundo fator de iniciação eucariótico-4G (eIF4G), mediante uma via independente da mTOR. O fator eIF4E associado ao eIF4G forma o complexo ribossomal eIF4F, que regula a iniciação da tradução, por mediar a ligação dos RNAm com o complexo de pré-inicialização 43S. Além disso, a mTOR fosforila a proteína ribossomal S6 quinase-1 de 70 kDa (S6K1), ativando-a. A S6K1, quando ativada, fosforila e ativa a proteína ribossomal S6, que por sua vez, favorece a tradução do grupo de RNAm característico de proteínas ribossomais e fatores de elongação (YANG e GUAN, 2007). Dessa maneira, a leucina também consegue estimular a síntese de complexos que são responsáveis pelo processo da tradução proteica, aumentando, em última análise, a capacidade celular de síntese proteica (KIMBALL e JEFFERSON, 2006).

Figura 1. Regulação da via da mTOR pela leucina. Adaptado de Hinault *et al.* (2006).

Também podemos assinalar que, foi observado que a leucina estimula essa síntese de proteínas durante condições catabólicas (VOLPI *et al.*, 2003; DONATO *et al.*, 2007). Alguns autores observaram que a suplementação de leucina (3 %) foi capaz de promover retenção de nitrogênio na carcaça de ratas *Wistar* grávidas com câncer (VENTRUCCI *et al.*, 2001; 2002). O mesmo foi verificado em ratos suplementados com dieta rica em leucina (18 % de proteína + 3% de leucina) durante a fase de recuperação nutricional, após um período de desnutrição proteica (60 dias recebendo dieta pobre em proteína, 6 % de proteína na dieta) (VENTRUCCI *et al.*, 2004).

Além disso, O'Connor *et al.* (2003) observaram que a elevação da síntese proteica no músculo esquelético de porcos neonatos em resposta à infusão de aminoácidos é mediada pela ativação de eIF da tradução. De maneira semelhante, Escobar *et al.* (2006) reportaram que uma oferta suprafisiológica de leucina (400 $\mu\text{mol/kg}$), mas não de isoleucina e valina, permite que este aminoácido atue como um nutriente sinalizador para induzir elevação da síntese proteica no músculo esquelético e cardíaco de porcos neonatos, pela elevação da ativação de eIF da tradução, mais especificamente de eIF4E, que é necessário à formação do complexo eIF4F (Figura 1).

Nessa perspectiva Ventrucchi, Mello e Gomes-Marcondes (2007) constataram que a suplementação de leucina (3 %) na dieta de ratas grávidas com câncer elevou a expressão da proteína quinase S6K1 e de eIF da tradução. Diante dos resultados, foi sugerido que a dieta rica em leucina promove aumento na síntese proteica no músculo esquelético de ratas grávidas com tumor, possivelmente, por meio da ativação de fatores eIF e/ou da via S6K1, demonstrando o papel da leucina na estimulação do processo de tradução proteica.

Mais recentemente, Ross *et al.* (2007) averiguaram que a mTOR é altamente expressada no epitélio placentário humano e que a inibição da mTOR placentária promove diminuição significativa na captação de leucina pela célula em amostras de vilos placentários. Os autores sugeriram que a diminuição do crescimento celular mediado pela inibição da mTOR poderia ser reforçado pela redução no transporte celular de leucina, considerando que a concentração intracelular de leucina é um ativador potente da via de sinalização da mTOR. Aliado a isto verificou-se que a atividade da mTOR

placentária é diminuída na RCIU, uma vez que foi constatado redução na expressão de S6K1 fosforilada na placenta de fetos com RCIU, definida pelo peso ao nascer inferior ao percentil 3 para bebês a termo (37-41 semanas e 6 dias).

Nesse sentido, Zhu *et al.* (2004) observaram que a restrição alimentar materna (50 %) afeta negativamente a síntese proteica muscular do feto, manifestada por um retardo no desenvolvimento muscular com redução no número de miofibrilas secundárias, possivelmente em função de um decréscimo na sinalização promovida pela mTOR.

Embora os efeitos da leucina no estímulo da síntese proteica sejam importantes, observa-se em dietas restritas em proteína, contendo altas concentrações de leucina, redução das concentrações de valina e isoleucina no organismo, sendo este fenômeno denominado “paradoxo da leucina”. Tal fato pode ser em parte justificado pela estimulação da oxidação dos BCAA, por meio da ativação mediada pela leucina de um complexo denominado complexo enzimático desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR), o qual depleta os cetoácidos dos aminoácidos valina e isoleucina, afetando suas concentrações (SHIMOMURA e HARRIS, 2006). Além disso, é verificado que ocorre diminuição do crescimento de ratos quando o modelo de dieta restrita em proteína é utilizado, sobretudo quando há decréscimo nas concentrações de isoleucina ou valina na dieta (SAUBERLICH, 1961). Também observa-se que além da redução do crescimento (HARPER, MILLER e BLACK, 1984), há diminuição no consumo alimentar quando se suplementa isoladamente qualquer um dos BCAA e há a deficiência de pelo menos um dos BCAA na dieta (ALLEN e BAKER, 1972).

Em resumo, o presente trabalho testou a hipótese de que a suplementação de BCAA é suficiente para anular ou minimizar os efeitos deletérios induzidos pela dieta materna restrita em proteína sobre o crescimento fetal. Esta hipótese foi baseada na ação dos BCAA atuando não só como substratos, mas também como moduladores do processo de síntese proteica, por meio da ativação da via de sinalização intracelular da mTOR.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que o crescimento fetal é primariamente determinado pelo suprimento de nutrientes, não é surpreendente que variações na dieta materna no decorrer da gestação possam refletir em alterações na saúde fetal.

Nesse sentido, diversos modelos experimentais, especialmente modelos que utilizam dieta restrita em proteína, têm sido delineados a fim de induzir à RCIU, uma vez que este tem sido relacionado ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta (McARDLE *et al.*, 2006).

Embora na literatura esteja amplamente reportado que a desnutrição é caracterizada por um desequilíbrio e/ou uma carência de nutrientes no organismo (GURMINI *et al.*, 2005), com a emergente importância de sensores nutricionais intracelulares, como a mTOR, é de se considerar a possibilidade de que os efeitos da desnutrição sejam consequência de alterações em vias sinalizatórias e não simplesmente falta de substrato.

Diante do exposto, um ponto que merece ser investigado é se a suplementação de BCAA, seria capaz de atenuar os efeitos mediados pela desnutrição proteica materna, considerando que estes aminoácidos, especialmente a leucina, são potentes ativadores da via da mTOR, a qual é responsável pela regulação da via de sinalização da síntese proteica.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de BCAA em proles de fêmeas submetidas à desnutrição proteica durante a gestação. A hipótese do estudo é de que a suplementação seja capaz de anular e/ou minimizar os efeitos deletérios induzidos pela desnutrição proteica materna, mediante a ativação da mTOR.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito da suplementação de BCAA sobre a composição corporal e a massa de órgãos;
- Investigar o efeito desta suplementação sobre parâmetros indicativos do estado nutricional proteico;
- Examinar a influência desta suplementação na cascata de sinalização ativada pela proteína quinase mTOR, mediante a investigação da expressão de componentes chaves envolvidos na tradução da síntese proteica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O presente estudo foi realizado em proles de ratas albinas *Wistar* adquiridas do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As matrizes foram mantidas em gaiolas individuais, em ambiente climatizado a 22 ± 2 °C, com umidade relativa do ar de 55 ± 10 % e com ciclo biológico de 12 h claro/12 h escuro. Estas tiveram livre acesso à água e à ração, durante todo o experimento. Todos os procedimentos com os animais foram submetidos e aprovados em 10/12/2007 (Protocolo CEEA nº 158), pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo segundo os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 Desenho experimental

As ratas *Wistar* albinas virgens foram fornecidas pelo biotério com dois meses de idade. Previamente ao acasalamento, estas passaram por um período de adaptação que compreendeu de duas a quatro semanas, a fim de que se adaptassem às condições da sala e à manipulação. Durante este período as ratas tiveram livre acesso à ração fornecida pelo biotério (ração comercial - Nuvital). Posteriormente ao período de adaptação as ratas foram acasaladas (10-12 semanas de idade), com ratos adultos de mesma raça, sexualmente experientes. A inseminação foi confirmada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. O dia seguinte à confirmação determinou o primeiro dia de prenhes, período que iniciou a intervenção experimental, na qual as matrizes iriam receber no decorrer da gestação, dieta restrita em proteína e com diferentes suplementações de aminoácidos, ou dieta

controle. Para tanto, as matrizes foram distribuídas, aleatoriamente, em quatro grupos de acordo com a dieta que foi fornecida. Sendo:

- **Grupo controle (CON):** ração controle – AIN93-G (20 % de caseína) (n=15);
- **Grupo aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA):** ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % de BCAA (n=15);
- **Grupo valina/isoleucina (VAL/ISO):** ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 2 % de VAL e 2 % de ISO (n=15);
- **Grupo aminoácidos essenciais (AAE):** ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % dos aminoácidos essenciais: lisina, tirosina e treonina (n=15).

O Grupo VAL/ISO foi criado com o objetivo de isolar os possíveis efeitos que a oferta do aminoácido leucina poderia promover, quando fornecido na suplementação de BCAA.

O Grupo AAE foi criado com o objetivo de anular o efeito que a oferta de três aminoácidos essenciais, diferentes dos BCAA, poderia ter sob o estado induzido pela dieta restrita em proteína.

Assim que os filhotes nasceram, aproximadamente 22 dias após a concepção, determinou-se o sexo dos mesmos mediante a avaliação da distância anogenital. Subsequentemente estes foram eutanasiados para análise dos tecidos.

O presente trabalho foi dividido em três experimentos de acordo com as análises que seriam realizadas nos filhotes. Os experimentos I e II foram submetidos ao mesmo protocolo, desde o acasalamento até o momento da eutanásia dos animais. No experimento III, o protocolo inicial foi semelhante, contudo o processo de eutanásia foi diferenciado em relação aos demais experimentos.

- **Experimento I:** pesagem de órgãos e análise da composição química da carcaça (n=5 matrizes por grupo/ oito filhotes por matriz, mantendo a proporção de quatro machos para quatro fêmeas, sempre que possível);
- **Experimento II:** dosagem de albumina sérica e determinação das concentrações de proteína e RNA hepático e muscular (n=5 matrizes por grupo/ *pool* de quatro filhotes por matriz);
- **Experimento III:** investigação das proteínas componentes da via de sinalização que regula a iniciação da tradução proteica (mTOR, S6K1 e 4EBP-1) (n=5 matrizes por grupo/ um filhote por matriz).

Com relação às matrizes, estas também foram eutanasiadas para análise no soro de albumina e proteínas totais. Isto ocorreu logo após a eutanásia dos filhotes.

Figura 2. Desenho Experimental.

Grupos CON: ração controle - AIN93-G (20 % de caseína); VAL/ISO: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 2 % de valina e 2 % de isoleucina; AAE ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % dos aminoácidos essenciais - lisina, tirosina e treonina; e BCAA: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % de aminoácidos de cadeia ramifica - leucina, valina e isoleucina.

4.3 Dieta

As rações foram preparadas em nosso laboratório e seguiram as recomendações do *American Institute of Nutrition* para roedores em crescimento (AIN93-G) (REEVES *et al.*, 1997), entretanto as rações suplementadas (BCAA, VAL/ISO e AAE) foram modificadas. O teor de proteína da dieta derivado da caseína foi reduzido a 5 %, além da adição de 4% de aminoácidos conforme cada grupo experimental.

Na ração suplementada com BCAA 40 g de amido foram substituídos por 18 g de leucina, 12 g de valina e 10 g de isoleucina, respeitando a proporção da quantidade destes quando fornecidos associados como suplementação de BCAA. Esta proporção corresponde a 45% de leucina, 30% de valina e 25% de isoleucina (KARLSSON *et al.*, 2004). A quantidade suplementada de BCAA encontra-se dentro do nível de ingestão que não resulta qualquer efeito adverso (*no observed adverse effect level- NOAEL*), como toxicidade, mortalidade, restrição do crescimento e do consumo alimentar, que para ratas é de 5% para leucina e 2,5% para valina e isoleucina (BAKER, 2005).

Na ração suplementada com valina e isoleucina, substituiu-se 40 g de amido por 20 g de VAL e 20 g de ISO; na ração de AAE os aminoácidos escolhidos foram selecionados por serem os mais abundantes dentre os essenciais, quando excluídos os BCAA da dieta para roedores adultos (REEVES, NIELSEN & FAHEY, 1993). A quantidade suplementada de cada aminoácido foi equivalente à quantidade suplementada de BCAA. Assim a suplementação dos aminoácidos lisina, tirosina e treonina, foi respectivamente proporcional a dos aminoácidos leucina, valina e isoleucina (Tabela 1), ponderando a quantidade absoluta destes presente na dieta.

A ração foi fornecida na forma de peletes. Estas rações foram analisadas através da sua composição centesimal (umidade, lipídeos, proteínas e carboidratos) seguindo a mesma metodologia utilizada na determinação química da carcaça (Tabela 3). Adicionalmente, foi realizado aminograma para a confirmação do conteúdo dos aminoácidos presentes nas rações (Tabela 2).

Tabela 1. Composição das rações utilizadas.

INGREDIENTES (g/kg de ração)	GRUPO CON	GRUPO VAL/ISO¹	GRUPO AAE²	GRUPO BCAA³
Amido	529,486	639,486	639,486	639,486
Caseína	200,0	50,0	50,0	50,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0
Óleo de soja	70,0	70,0	70,0	70,0
Celulose	50,0	50,0	50,0	50,0
Mistura salina	35,0	35,0	35,0	35,0
Mistura vitamínica	10,0	10,0	10,0	10,0
L-cistina	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Tetrabutylhidroquinona	0,014	0,014	0,014	0,014
L-leucina	0,0	0,0	0,0	18,0
L-valina	0,0	20,0	00	12,0
L-isoleucina	0,0	20,0	0,0	10,0
L-lisina	0,0	0,0	18,0	0,0
L-tirosina	0,0	0,0	12,0	0,0
L-treonina	0,0	0,0	10,0	0,0

¹ração restrita em proteína (5 %) e suplementada com 2 % de valina + 2 % de isoleucina

²ração restrita em proteína (5 %) e suplementada com 4 % de AAE (45 % de lisina, 30 % de tirosina e 25 % de treonina)

³ração restrita em proteína (5 %) e suplementada com 4 % de BCAA (45 % de leucina, 30 % de valina e 25 % de isoleucina)

Tabela 2. Aminograma das rações.

	GRUPO CON	GRUPO VAL/ISO¹	GRUPO AAE²	GRUPO BCAA³
Proteína				
Bruta	16,67	7,35	7,5	6,81
Ác. Aspártico	1,16	0,25	0,29	0,27
Ác. Glutâmico	3,77	0,94	0,98	0,94
Serina	0,95	0,24	0,25	0,24
Glicina	0,33	0,09	0,09	0,09
Histidina	0,43	0,11	0,11	0,10
Arginina	0,63	0,16	0,11	0,16
Treonina	0,67	0,16	1,05	0,15
Alanina	0,56	0,15	0,15	0,14
Prolina	1,69	0,43	0,46	0,43
Tirosina	0,91	0,22	1,24	0,21
Valina	1,22	2,52	0,32	1,56
Metionina	0,65	0,13	0,13	0,12
Cistina	0,15	0,17	0,18	0,24
Isoleucina	0,93	2,25	0,25	1,22
Leucina	1,69	0,43	0,46	2,17
Fenilalanina	0,86	0,22	0,23	0,21
Lisina	1,36	0,37	1,67	0,38
Soma dos aminoácidos	17,96	8,84	7,94	8,62

¹ração restrita em proteína (5 %) e suplementada com 2 % de valina + 2 % de isoleucina

²ração restrita em proteína (5 %) e suplementada com 4 % de AAE (45 % de lisina, 30 % de tirosina e 25 % de treonina)

³ração restrita em proteína (5 %) e suplementada com 4 % de BCAA (45 % de leucina, 30 % de valina e 25 % de isoleucina)

Tabela 3. Composição centesimal das rações.

Grupo	Umidade (%)	Proteína (%)	Carboidrato (%)	Gordura (%)	Kcal/100g
CON	10,3	17,3	66,1	6,3	390,4
VAL/ISO	10,7	7,9	74,9	6,4	389,5
AAE	10,4	7,9	75,4	6,3	390,2
BCAA	10,7	7,9	74,9	6,5	389,7

¹ração restrita em proteína e suplementada com 2 % de valina + 2 % de isoleucina

²ração restrita em proteína e suplementada com 4 % de AAE (45 % de lisina, 30 % de tirosina e 25 % de treonina)

³ração restrita em proteína e suplementada com 4% de BCAA (45 % de leucina, 30 % de valina e 25 % de isoleucina)

4.4 Determinação do peso corporal e do consumo de ração das matrizes

As matrizes foram pesadas três vezes por semana em uma balança com precisão de 0,1 g (Marte AL 5000). Nestes mesmos dias, a ração foi fornecida e o consumo do período foi determinado. Para a avaliação do consumo de ração foi calculada a diferença entre a quantidade de ração colocada anteriormente e a restante. O ganho de peso gestacional (GPG) foi determinado mediante a diferença entre o peso corporal no 1º e 20º dia de gestação. A água dos bebedouros foi trocada duas vezes por semana.

4.5 Eutanásia dos animais e coleta das amostras

4.5.1 Eutanásia e coleta das amostras dos filhotes

Nos dias prováveis do nascimento dos filhotes as matrizes foram monitoradas frequentemente a fim de evitar o canibalismo. Quando observado o nascimento do primeiro filhote, o pesquisador se retirou da sala e só retornou após uma hora e meia, aproximadamente, tempo estimado para o nascimento

de todos os filhotes. Em seguida, os filhotes foram pesados em balança analítica com precisão de 0,0001 g (Ohaus) e acondicionados em uma caixa separada da mãe, antes que fossem amamentados. A eutanásia teve início imediatamente após a separação dos filhotes e o tempo aproximado para o sacrifício do primeiro ao último filhote foi de quarenta minutos.

Os filhotes foram anestesiados por via intraperitoneal com 100 µl de solução, contendo cloridrato de xilazina (20 mg/mL), cloridrato de cetamina (100 mg/mL), acepromazina (20 mg/mL) e água destilada. No experimento I, os filhotes foram dissecados e pesados em balança analítica com precisão de 0,0001 g (Ohaus): coração, intestino, pâncreas, estômago, rins, baço e fígado. Logo após estes órgãos retornaram à carcaça. A partir da mesma foi realizada a avaliação da sua composição química, a fim de se determinar o conteúdo de umidade, proteína e lipídeos.

No experimento II para determinar a análise de albumina sérica, após a administração da anestesia, o sangue foi coletado do plexo axilar, centrifugado (Jouan BR4i) (4 °C, 3.000 rpm, 15 minutos), e armazenado em freezer (-80 °C) até o momento da análise. Nestes animais ainda foram dissecados e pesados o fígado e os músculos gastrocnêmios em balança analítica com precisão de 0,0001 g (Ohaus), e armazenados em freezer (-80 °C), para posterior determinação de proteína e RNA totais. O restante da carcaça foi descartado. Considerando que a quantidade de amostra sérica e muscular de um filhote era insuficiente para realização destas análises, um *pool* de filhotes da mesma matriz foi feito, sendo de quatro animais para amostra sérica e dois para muscular.

No experimento III, no dia provável de nascimento dos filhotes (22º dia de gestação) realizou-se cesárea nas matrizes, que foram previamente anestesiadas, a fim de garantir que a coleta dos fígados dos animais fosse feita em tempos mais próximos possíveis. Os fígados foram dissecados simultaneamente, por dois pesquisadores, rapidamente inseridos em nitrogênio líquido, homogeneizados em tampão de extração e armazenados em freezer (-80 °C) em solução tampão contendo inibidor de protease (P8340 Sigma-Aldrich) e fosfatase (P 2850 e P5726 Sigma-Aldrich) até o momento da análise, a qual investigou a expressão total e a fosforilação de mTOR, S6K1 e 4EBP-1.

4.5.2 Eutanásia e coleta das amostras das matrizes

Após a eutanásia dos filhotes as matrizes foram anestesiadas com 1 mL de coquetel para roedores (via subcutânea) (1/1/0,4/1,6 v/v) de cloridrato de xilazina (20 mg/mL), cloridrato de cetamina (100 mg/mL), acepromazina (20 mg/mL) e água destilada, aplicado por meio de uma seringa de insulina com agulha 20-G. Posteriormente, estas foram sacrificadas por decapitação, utilizando-se uma guilhotina. Este procedimento foi realizado de forma muito rápida, visando minimizar qualquer tipo de sofrimento ou estresse, por parte dos animais.

Posteriormente à decapitação, o sangue do tronco foi coletado em um tubo, centrifugado (4 °C, 3.000 rpm, 15 minutos) e armazenado em freezer (-80 °C) para determinações séricas futuras de proteínas totais e albumina. As carcaças das matrizes foram descartadas.

4.6 Composição química da carcaça

4.6.1. Conteúdo de umidade na carcaça

A umidade da carcaça dos animais foi determinada por meio da técnica de secagem em estufa, que se baseia na remoção da água por aquecimento (CECCHI, 1999). As carcaças foram acondicionadas individualmente em embalagens de papel alumínio, pesadas em balança com precisão de 0,0001 g (Ohaus) e colocadas em estufa ventilada (Mod. 171, Soc. Fabbe Ltda, São Paulo) à temperatura de 70 °C, durante 1 dia. Após este período, a carcaça foi novamente pesada e a umidade, em termos absoluto, foi obtida pela diferença entre o peso da carcaça úmida (g) e o peso da carcaça seca (g).

4.6.2 Conteúdo de gordura na carcaça

Toda a carcaça seca foi envolvida por papel filtro (Whatman, n. 54) para a determinação da gordura, que foi realizada pela técnica de extração com

solvente, utilizando-se o aparelho Soxhlet (Infratec mult TE 188, Marconi, São Paulo) e o solvente éter etílico (LabSynth, p.a.) (CECCHI, 1999). Esta técnica baseia-se: 1^o - na extração da gordura da amostra com solvente por 1 dia (~8h/dia), 2^o - na eliminação do solvente por evaporação e 3^o - na determinação da gordura extraída por pesagem.

4.6.3 Conteúdo de proteína na carcaça

O restante da carcaça, sem umidade e gordura, foi totalmente moído (moinho Ika M20 universal mill). Este processo resultou em um pó uniforme, que foi utilizado para a determinação da proteína da carcaça, por meio do método de Kjeldahl (CECCHI, 1999). Tal método baseia-se na determinação do percentual de nitrogênio da amostra, o qual pode ser convertido em percentual de proteína, quando multiplicado pelo fator arbitrário de 6,25. Este fator representa a proporção de nitrogênio presente na proteína em questão, que é em torno de 16 %. O percentual de nitrogênio da amostra foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\% N = \{[(\text{mL HCL amostra} - \text{mL HCL branco}) \times N \times FC \times 14,007] / \text{mg da amostra}\} \times 100$$

onde:

% N = percentual de nitrogênio da amostra;

mL HCL = volume gasto de ácido clorídrico;

N = normalidade do HCl;

FC = fator de correção do ácido;

14,007 = peso equivalente do nitrogênio;

mg da amostra = massa da amostra analisada.

O percentual de proteína da amostra foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Proteína da amostra} = \% \text{ N} \times 6,25$$

onde:

% Proteína = percentual de proteína da amostra;

% N = percentual de nitrogênio da amostra;

6,25 = fator arbitrário indicativo do conteúdo de nitrogênio da amostra proteica em questão (aproximadamente 16% do total).

O conteúdo de proteína na carcaça foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Proteína na carcaça (g)} = [\text{carcaça seca (g)} - \text{lipídeo total (g)}] \times (\% \text{ Proteína da amostra}/100)$$

4.6.4 Quantidade e percentual da MM na carcaça

A quantidade de MM foi calculada subtraindo-se o valor absoluto de gordura, da massa total da carcaça.

4.7 Parâmetros teciduais

4.7.1 Extração de proteína e RNA do fígado e do músculo gastrocnêmio

O fígado e os músculos gastrocnêmios, foram colocados em nitrogênio líquido, pulverizados em placas de alumínio, pesados e imediatamente homogeneizados com 6 mL de ácido tricloroacético (Merck Chemical®, p.a.) 10%, gelado, sendo, posteriormente, centrifugados a 3.000 rpm por 15 minutos, à temperatura de 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso com 10 mL de ácido perclórico (PCA, Merck Chemical®, p.a.) 2%, gelado, e centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos, à temperatura de 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido com 10 mL de NaOH (LabSynth, p.a.) 0,3N e mantido em banho aquecido (Haake SWB 20, Gebrüder Haakegmbh, Karlsruhe, Germany) por 1 hora, à temperatura de 37 °C. Durante este período foi utilizado um bastão de vidro a fim de que qualquer coágulo formado nos tubos fosse dissolvido. Em seguida, cerca de 5 mL foram retirados e congelados a – 20 °C para posterior determinação da concentração de proteína da amostra.

O restante da solução foi resfriado em gelo durante 10 minutos. Posteriormente, foi acrescentado 2 mL de PCA (20%) gelado, homogeneizado com bastão de vidro e mantido em gelo por 10 minutos. Em seguida, foi centrifugado por 15 minutos, 3.000 rpm, à temperatura de 4 °C. Uma parte do sobrenadante (5 mL) foi armazenada a – 20 °C para posterior determinação da concentração de RNA da amostra, enquanto o restante do sobrenadante foi desprezado.

4.7.2 Concentração da proteína muscular e hepática

A concentração de proteína hepática e muscular (gastrocnêmio) foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Lowry *et al.* (1951). Seu princípio consiste na hidrólise alcalina das proteínas da amostra e na formação

de um complexo de cor azul, a partir da reação com o reagente de Folin-Ciocalteu (Merck Chemical®, p.a.). A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de proteína da amostra, que foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu mini 1240, Shimadzu Corporation, Kioto, Japan), adotando um comprimento de onda de 660 nm. A concentração de proteína da amostra foi calculada a partir de uma curva-padrão de albumina de soro bovino (A-8022, Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA).

4.7.3 Concentração do RNA muscular e hepático

As concentrações de RNA no fígado e no músculo gastrocnêmio foram determinadas pelo método descrito por Munro & Fleck (1966). Neste método, lê-se em espectrofotômetro a 260 nm, utilizando cubetas de quartz, o sobrenadante obtido após processo de extração de proteína da amostra, e considera-se que cada grau de extinção, a 260 nm, corresponde a 32 µg de RNA por mL de solução analisada.

4.8 Parâmetros séricos

4.8.1 Concentração de proteínas totais no soro

A concentração de proteínas totais presente no soro das matrizes foi determinada pelo método colorimétrico do reativo de biureto (sulfato de cobre a 10%) (HENRY, 1974). O princípio do método consiste na reação das ligações peptídicas das proteínas com o cobre (Cu^{2+}) em meio alcalino, dando origem a um complexo de cor violeta, cuja intensidade de coloração é proporcional à concentração de proteína na amostra. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 545 nm e as concentrações foram obtidas contra curva de calibração, realizada com um padrão de proteínas totais (LabTest, Cat. 99, Minas Gerais).

4.8.2 Concentração da albumina sérica

A concentração de albumina presente no soro dos filhotes e das matrizes foi determinada pelo método colorimétrico de verde de bromocresol (DOUMAS, WATSON & BIGGS, 1971). O princípio do método consiste na reação da albumina presente na amostra com o verde de bromocresol (Merck Chemical®, p.a.) em meio ácido (pH 4,0), formando um complexo de cor verde, cuja intensidade de coloração é proporcional à concentração de albumina na amostra. O procedimento constitui em adicionar 25 µl do soro em 5 ml do reagente de cor, contendo solução de verde de bromocresol a 0,60 mMol, tampão de succinato 0,1 M (Merck) e surfactante não iônico 35 %, em pH 4,0. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro (Shimadzu mini 1240) a 628nm e as concentrações determinadas contra curva linear de calibração de albumina de soro bovino (A-8022, Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA), nas concentrações de 2,3,4,5 e 6 g/dL.

4.9 Parâmetros moleculares

No fígado dos filhotes foi avaliada, por meio da análise de *Western Blotting*, a expressão das proteínas: mTOR, S6K1 e 4E-BP1; bem como a fosforilação destas em Ser₂₄₄₈, Thr₃₈₉, e Thr₇₀, respectivamente.

4.9.1 Western Blotting

4.9.1.1 Extração de proteínas

Inicialmente, o fígado foi pesado e pulverizado em nitrogênio líquido por cerca de dez segundos. Posteriormente, foi mantido em tubos criogênicos até a extração.

O tecido foi, então, homogeneizado em tampão de extração contendo 50 mM tampão de fosfato de potássio (pH 7,00), 0,3 M sacarose, 0,5 mM DL-ditiotreitol, 1 mM EDTA (pH 8,00), 0,3 mM PMSF, 10 mM NaF, 1:100

Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 (Sigma-Aldrich), 1:100 Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Sigma-Aldrich), Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich). Para a homogeneização utilizou-se homogeneizador elétrico tipo *polytron* (Ika T10 basic) na velocidade máxima, em 3 *burst* de cerca de 10 segundos. Entre a homogeneização de diferentes amostras, o homogeneizador foi lavado em álcool 70 % e água ultrapura. Durante todo o processo de homogeneização, os tubos contendo as amostras foram mantidos no gelo, no intuito de reduzir a atividade de fosfatases e enzimas proteolíticas.

As amostras foram, então, centrifugadas (Jouan BR4i) por 20 minutos a 12000 rpm e temperatura estabilizada em 4 °C. Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante que foi transferido para outro tubo, aliquoteado e armazenado em freezer (-80 °C).

4.9.1.2 Preparo do gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi preparado segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.* e Harlow & Lane, descrito sucintamente a seguir. Foram preparados géis em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5 %, 125 mM Tris (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % persulfato de amônia e 0,1 % TEMED. Os géis inferiores (resolutivos) foram preparados com poliacrilamida na concentração de 10 %, 380 mM Tris (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED.

4.9.1.3 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e Western blotting

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

4.9.1.4 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)

O gel contendo as proteínas fracionadas por eletroforese foi incubado por 10 min em tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS , 20 % metanol, pH 8,3). Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada e, então, incubada em tampão de transferência. Um "sanduíche" foi então montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel filtro de 3 mm, gel, membrana, 2 folhas de papel de filtro de 3 mm (Whatman) e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência, sob corrente de 25 V, por 90 min. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana, por 5 min, com corante Ponceau (1 % ponceau, 1 % ácido acético), seguida de lavagem com PBST [8 % NaCl, 0,2 % KCl, 0,2 % $\text{KH}_2(\text{PO})_4$, 1,15 % $\text{Na}_2\text{H}(\text{PO})_4$, 0,5 % Tween0mM.].

4.9.1.5 Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de albumina bovina a 5 %, em tampão PBST, por 60 min, sob agitação. O anticorpo específico para cada proteína de interesse foi diluído [1:250 para phospho-p70 S6K1(Thr389), 1:500 phospho-mTOR(Ser2448); 1:1000 para mTOR, phospho-4E-BP1(Thr70), p70 S6K1 e 4E-BP1] em PBST e utilizado para a incubação das membranas *overnight* sob agitação em geladeira à 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, por 5 min, com PBST e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:3000 em PBST, por 1 h, sob agitação em geladeira. A membrana foi lavada 3 vezes, por 5 min, com agitação.

4.9.1.6 Revelação com sistema Quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura de volumes iguais dos reagentes 1 e 2 do kit ECL *Advance* (GE Healthcare) composto por luminol, fenol e peróxido de hidrogênio e a mistura foi utilizada para umedecer as membranas. Os blots foram então visualizados por um sistema de bioimagem ImageQuant™ 400 (GE Healthcare) que capturou imagens por 5 minutos e analisados por um software ImageQuant TL (GE Healthcare).

4.10 Análise estatística

As comparações entre os grupos foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA One-way), seguida do teste de Tukey, para identificação dos contrastes significantes. A análise estatística foi realizada com o auxílio do *software* GraphPad Prism versão 4.0 (GraphPad Software, Inc). Em todas as análises um valor $P < 0,05$ foi adotado para identificar diferenças significativas. Todos os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1 Peso corporal inicial e final, e ganho de peso gestacional (GPG)

As matrizes não apresentaram diferença ($P > 0,05$) no peso corporal inicial (Figura 3 A) e depois do período experimental, **no qual adotou-se dieta restrita em** proteína (Figura 3 B). Por outro lado, o GPG foi menor nos grupos VAL/ISO, AAE e BCAA ($P < 0,05$) em comparação ao grupo CON (Figura 3 C).

Figura 3. Peso corporal inicial e final, e Ganho de Peso Gestacional (GPG) das matrizes dos grupos CON: ração controle - AIN93-G (20 % de caseína) (n=12); VAL/ISO: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 2 % de valina e 2 % de isoleucina (n=12); AAE: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % dos aminoácidos essenciais -lisina, tirosina e treonina- (n=12); e BCAA: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % de aminoácidos de cadeia ramifica -leucina, valina e isoleucina- (n=12). Resultados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. *valor significativamente diferente comparado ao grupo CON ($P < 0,05$).

5.2 Consumo da ração

Não houve diferença na média do consumo diário de ração, assim como de calorias e gordura, durante o período gestacional entre as matrizes dos grupos experimentais (Tabela 4). O consumo diário de proteínas nas matrizes submetidas ao protocolo de restrição proteica foi significativamente menor comparado ao grupo CON ($P < 0,05$).

Tabela 4. Consumo médio diário de ração, macronutrientes e calorias.

	Consumo (g/d)	Carboidrato (g/dia)	Proteína (g/dia)	Gordura (g/dia)	Kcal/dia
CON	19,55±2,23	12,33±2,01	3,23±0,52	1,17±0,19	76,33±8,72
ISO/VAL	17,63±2,71	13,02±2,09	1,38±0,28*	1,38±0,28	70,57±10,58
AAE	19,27±2,06	14,02±1,95	1,43±0,21*	1,22±0,17	75,16±8,05
BCAA	18,53±1,63	13,82±1,22*	1,47±0,13*	1,27±0,11	72,58±6,40

Consumo médio diário de ração, macronutrientes e calorias das matrizes dos grupos CON: ração controle - AIN93-G (20 % de caseína) (n=12); VAL/ISO: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 2 % de valina e 2 % de isoleucina (n=12); AAE ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % dos aminoácidos essenciais: lisina, tirosina e treonina- (n=12); e BCAA: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % de aminoácidos de cadeia ramificada - leucina, valina e isoleucina- (n=12). Resultados expressos em média ± desvio-padrão. *valor significativamente diferente comparado ao grupo CON ($P < 0,05$).

5.3 Número de filhotes no nascimento

O número de filhotes por matriz no nascimento não se diferenciou entre os grupos CON, VAL/ISO e BCAA. Todavia, o número de filhotes nascidos no grupo AAE foi significativamente menor ($P < 0,05$) em relação ao grupo BCAA (Tabela 5).

Tabela 5. Número de filhotes ao nascer por grupo.

	CON	VAL/ISO	AAE	BCAA
Nº de filhotes	11±2	9±4	8±2	12±1 [§]

Número de filhotes ao nascer dos grupos CON: ração controle - AIN93-G (20% de caseína) (n=8); VAL/ISO: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 2 % de valina e 2 % de isoleucina (n=8); AAE: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % dos aminoácidos essenciais: lisina, tirosina e treonina- (n=6); e BCAA: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % de aminoácidos de cadeia ramificada -leucina, valina e isoleucina- (n=8). Resultados expressos em média ± desvio-padrão. [§]valor significativamente diferente comparado ao grupo AAE ($P < 0,05$).

5.4 Parâmetros séricos matrizes

As matrizes dos grupos com dieta restrita em proteína apresentaram valores séricos de proteínas totais e albumina significativamente menores quando comparadas ao grupo que recebeu dieta controle ($P < 0,05$) (Figura 4 A, B).

Figura 4. Concentrações séricas de proteínas totais e albumina das matrizes dos grupos

CON: ração controle - AIN93-G (20% de caseína) (n=5); VAL/ISO: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 2 % de valina e 2 % de isoleucina (n=5); AAE: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % dos aminoácidos essenciais: lisina, tirosina e treonina- (n=5); e BCAA: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % de aminoácidos de cadeia ramificada - leucina, valina e isoleucina- (n=5). Resultados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. *valor significativamente diferente comparado ao grupo CON ($P < 0,05$).

5.5 Massa corporal e de órgãos dos filhotes

Com relação à massa corporal dos filhotes e à massa dos órgãos, observou-se redução significativa no peso corporal, no fígado e no estômago em todos os grupos submetidos à dieta materna restrita em proteína, quando comparados aos animais do grupo CON (Figura 5 A-C). Observou-se ainda redução significativa no peso do intestino nos filhotes que sofreram restrição proteica materna. Todavia, os animais do grupo BCAA apresentaram valores significativamente maiores que os animais dos grupos VAL/ISO e AAE (Figura 5H). Em relação aos órgãos: coração, pâncreas, baço e rins, apenas os grupos VAL/ISO e AAE apresentaram redução em suas massas. Em contrapartida, o grupo BCAA apresentou valores equivalentes aos encontrados no grupo CON, o qual não foi submetido à dieta materna restrita em proteína (Figura 5 D-G).

Figura 5. Pesos absolutos dos filhotes e de órgãos referentes aos grupos.

CON: ração controle - AIN93-G (20 % de caseína) (n=40); VAL/ISO: ração AIN93-G restrita em proteína (5% de caseína) e suplementada com 2 % de valina e 2 % de isoleucina (n=44); AAE: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % dos aminoácidos essenciais: lisina, tirosina e treonina (n=33); e BCAA: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % de aminoácidos de cadeia ramificada - leucina, valina e isoleucina- (n=40). Resultados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. *valor significamente diferente do grupo CON. †valor significamente diferente do grupo VAL/ISO. §valor significamente diferente do grupo AAE ($P < 0,05$).

5.6 Composição química da carcaça

No que concerne à análise da composição química da carcaça, os grupos experimentais submetidos à dieta restrita em proteína (VAL/ISO, AAE e BCAA) apresentaram diminuição significativa da umidade, do conteúdo de proteína e da massa magra em relação ao grupo CON (Figura 6 A, B, D). Com relação à quantidade de lipídeos, os grupos VAL/ISO e AAE apresentaram valores significativamente reduzidos ($P < 0,05$) em comparação ao grupo CON. Por outro lado, os animais do grupo BCAA mantiveram um conteúdo corporal de gordura equivalente ao grupo CON (Figura 6 C).

Figura 6. Composição química da carcaça dos filhotes referentes aos grupos.

CON: ração controle - AIN93-G (20 % de caseína) (n=40); VAL/ISO: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 2 % de valina e 2 % de isoleucina (n=44); AAE: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % dos aminoácidos essenciais: lisina, tirosina e treonina (n=33); e BCAA: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % de aminoácidos de cadeia ramificada - leucina, valina e isoleucina- (n=40). Resultados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. *valor significativamente diferente do grupo CON. †valor significativamente diferente do grupo VAL/ISO. §valor significativamente diferente do grupo AAE ($P < 0,05$).

5.7 Parâmetros indicativos do estado nutricional proteico

5.7.1 Concentração de RNA e de proteína no fígado e no músculo gastrocnêmio

O grupo BCAA apresentou aumento significativo da concentração de proteína no fígado e no músculo gastrocnêmio em relação aos grupos CON, VAL/ISO e AAE (Figura 7 A, C). Além disso, o grupo BCAA apresentou aumento da concentração de RNA no fígado e no músculo, em comparação aos demais grupos ($P < 0,05$) (Figura 7 B, D).

Figura 7. A e B) Concentração de proteína e RNA no fígado de filhotes dos grupos.

CON: ração controle - AIN93-G (20 % de caseína) (n=18); VAL/ISO: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 2 % de valina e 2 % de isoleucina (n=20); AAE: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % dos aminoácidos essenciais: lisina, tirosina e treonina (n=14); e BCAA: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % de aminoácidos de cadeia ramificada - leucina, valina e isoleucina- (n=19); C e D) e no músculo gastrocnêmio de filhotes dos grupos CON: ração controle - AIN93-G (20 % de caseína) (n=14), VAL/ISO: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 2 % de valina e 2 % de isoleucina (n=16); AAE: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % dos aminoácidos essenciais: lisina, tirosina e treonina (n=14); e BCAA: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % de aminoácidos de cadeia ramificada - leucina, valina e isoleucina- (n=16). Resultados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. *valor significativamente diferente do grupo CON. †valor significativamente diferente do grupo VAL/ISO. §valor significativamente diferente do grupo AAE ($P < 0,05$).

5.7.2 Concentração de albumina sérica

A Figura 8 apresenta os valores médios da concentração de albumina sérica dos filhotes. Esta variável apresentou as mesmas tendências entre os diferentes grupos, pois se pode notar que não houve diferença significativa neste parâmetro ($P > 0,05$).

Figura 8. Concentração de albumina sérica de filhotes dos grupos.

CON: ração controle - AIN93-G (20 % de caseína) (n=7); VAL/ISO: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 2 % de valina e 2 % de isoleucina (n=7); AAE: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % dos aminoácidos essenciais: lisina, tirosina e treonina (n=7); e BCAA: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % de aminoácidos de cadeia ramificada - leucina, valina e isoleucina- (n=7). Resultados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. Nível de significância adotado ($P < 0,05$).

5.8 Via de sinalização da mTOR

Verificou-se que os filhotes de matrizes que receberam dieta materna restrita em proteína e suplementada com AAE apresentaram diminuição significativa na expressão total da mTOR em relação aos demais grupos submetidos à dieta materna restrita em proteína (Figura 9 A). A expressão total das demais proteínas ativadas pela via de sinalização da mTOR (S6k1 e 4EBP-1) foi semelhante entre os grupos (Figura 9 C, E). Além disso, avaliou-se a fosforilação destas proteínas, respectivamente, em Ser2448, Thr389 e Thr70 (Figura 9 B, D, F). Neste contexto, somente a suplementação com BCAA foi capaz de promover aumento significativo da fosforilação da mTOR em relação aos grupos CON e AAE (Figura 9 B).

Figura 9. Quantificação da expressão total das proteínas mTOR, S6k1 e 4EBP-1 e de suas respectivas fosforilações em Ser₂₄₄₈, Thr₃₈₉, e Thr₇₀, no fígado de filhotes dos grupos.

CON: ração controle - AIN93-G (20 % de caseína) (n=7); VAL/ISO: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 2 % de valina e 2 % de isoleucina (n=4); AAE: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % dos aminoácidos essenciais: lisina, tirosina e treonina (n=4); e BCAA: ração AIN93-G restrita em proteína (5 % de caseína) e suplementada com 4 % de aminoácidos de cadeia ramificada - leucina, valina e isoleucina- (n=5). Resultados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. *valor significativamente diferente do grupo CON. §valor significativamente diferente do grupo AAE (P < 0,05).

6. DISCUSSÃO

Nosso estudo testou a hipótese de que a suplementação de BCAA seria suficiente para anular ou minimizar os efeitos deletérios induzidos pela dieta materna pobre em proteína sobre o crescimento fetal, considerando que estes aminoácidos estariam atuando não só como substratos, mas também como moduladores do processo de síntese proteica, mediante o acréscimo no estímulo à tradução de proteínas. Neste contexto, observou-se que nosso protocolo de restrição proteica materna causou redução no crescimento corporal e na massa de órgãos das proles. Estes resultados foram encontrados de forma consistente nos grupos submetidos à desnutrição e suplementados com VAL/ISO e AAE, demonstrando que estas suplementações não são suficientes para recuperar os efeitos da desnutrição proteica no decorrer da gestação. Por outro lado, a suplementação BCAA foi eficaz em minimizar ou mesmo em restaurar plenamente diversos parâmetros como peso de órgãos, massa de gordura da carcaça e parâmetros indicativos do estado nutricional proteico, como as concentrações de proteína e RNA hepáticas e musculares.

Com relação às matrizes, a massa corporal destas no início e ao final do experimento foi semelhante entre os grupos, entretanto os grupos submetidos à desnutrição proteica materna apresentaram GPG inferior ao grupo CON (Figura 3). Os dados referentes ao peso inicial e final das matrizes estão de acordo com a literatura, a qual aponta que não há alteração da massa corporal em função do protocolo experimental de desnutrição proteica (RESS *et al.*, 2006; TORRENS *et al.*, 2009). Por outro lado, estes estudos não apontam alteração do GPG, como foi observado no presente trabalho.

Em concordância aos nossos dados, Heywood *et al.* (2004) e Jansson *et al.* (2006) também verificaram redução do GPG em matrizes submetidas à desnutrição proteica no decorrer da gestação. Uma possível explicação poderia estar vinculada à redução do consumo alimentar em função da alteração dietética realizada (DU, HIGGINBOTHAM e WHITE, 2000), contudo o consumo alimentar diário das matrizes não se diferenciou nos grupos submetidos à desnutrição quando comparados ao grupo CON (Tabela 4). Apesar da controvérsia existente em relação ao consumo de ratos alimentados com dieta restrita em proteína, tem sido sugerido que animais submetidos à esta dieta

elevam seu consumo alimentar na tentativa de restabelecer sua necessidade proteica (WEBSTER, 1993). O acréscimo do consumo é acompanhado de decréscimo na eficiência alimentar e aumento no gasto de energia na tentativa de dissipar a energia excedente (SPECTER *et al.*, 1995). Estas modificações na eficiência metabólica parecem ser resultantes da termogênese adaptativa induzida pela dieta (ROTHWELL e STOCK, 1987). Vale ressaltar que, embora as rações dos grupos submetidos à desnutrição proteica fossem restritas em proteína, estas eram isocalóricas. Assim, considerando que a média do consumo alimentar diário foi equivalente entre os grupos experimentais, pode-se verificar que os efeitos deletérios observados sobre o crescimento fetal foram ocasionados em função do menor consumo de proteínas e não de calorias (Tabela 4).

Essa diferença constatada em relação ao GPG ainda poderia estar relacionada a dois fatores. Primeiro, ao número de filhotes e segundo à massa corporal destes. Os dados disponíveis na literatura indicam que a aplicação de uma dieta contendo entre 9 % e 10 % de proteína em matrizes no decorrer da gestação não diminui o número de proles (GALLAGHER *et al.*, 2005; ZAMBRANO *et al.*, 2006). Em contrapartida, quando a restrição proteica torna-se mais grave é verificada redução significativa neste parâmetro, como constado por Rees *et al.* (1999) quando utilizaram dieta contendo 6 % de proteína em fêmeas submetidas à desnutrição proteica gestacional. As rações dos grupos VAL/ISO, AAE e BCAA apresentaram 7,9% de proteína (Tabela 3). Todos os grupos desnutridos não apresentaram redução no número de filhotes em comparação ao grupo CON (Tabela 5), o que sugere que a diminuição do GPG não está relacionada ao número de filhotes. A massa corporal dos filhotes pode ser considerada outra variável que poderia influenciar o GPG, considerando que o protocolo adotado de dieta materna restrita em proteína causou redução na massa corporal destes (Figura 5 A).

A suplementação com BCAA reverteu parte do déficit observado no crescimento dos neonatos submetidos à dieta materna restrita em proteína, uma vez que foi capaz de recuperar parcialmente a massa corporal e do intestino e (Figura 5 A, H) e totalmente a massa de coração, baço, rins, e pâncreas (Figura 5 D, F, G, E), considerando que o peso destes órgãos não foi diferente em relação ao grupo CON. Os BCAA, particularmente a leucina, são

potentes ativadores da via da mTOR, que atua como um sensor celular nutricional que favorece o crescimento e a proliferação celular e é essencial à sinalização molecular para a iniciação da tradução proteica, isto poderia explicar os resultados encontrados em relação à massa corporal e dos órgãos no grupo BCAA, em comparação aos demais grupos submetidos à desnutrição proteica materna - VAL/ISO e AAE (Figura 5), possivelmente por estimular a síntese proteica. Estes achados tornam-se relevantes, haja vista que estas modificações na morfologia dos órgãos, mediadas pela RCIU, estão associadas ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta, como diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (LANGLEY-EVANS, 2001; HEYWOOD *et al.*, 2004), contudo os possíveis efeitos da suplementação de BCAA fornecida durante a gestação, na vida adulta de proles submetidas à restrição proteica materna, ainda não foram avaliados. Nos demais grupos submetidos à desnutrição proteica, a redução da massa corporal e dos órgãos avaliados pode ter sido mediada pela escassez de aminoácidos na dieta e, além disso, pela redução do fluxo sanguíneo placentário associado à desnutrição materna (ROSSO e KAVA, 1980), o que pode alterar o transporte placentário de nutrientes.

Aliado a isto, nosso estudo verificou que a desnutrição proteica materna afetou negativamente o desenvolvimento dos constituintes corporais, considerando que os valores absolutos de umidade, proteína e massa magra foram significativamente reduzidos (Figura 6 A, B, D). Por outro lado, a suplementação de BCAA no decorrer da gestação manteve a quantidade de gordura semelhante ao grupo que não sofreu desnutrição proteica (Figura 6 C). Mais recentemente, alguns estudos têm investigado a estimulação da síntese proteica pela leucina no tecido adiposo podendo favorecer a adipogênese. Dessa maneira tem sido proposto que no tecido adiposo a via da mTOR atua na diferenciação de pré-adipócitos, morfogênese do tecido adiposo e crescimento hipertrófico (LYNCH *et al.*, 2000). Além disso, a 4EBP-1, um dos substratos modulados pela via da mTOR, parece ser um novo regulador da adipogênese (TSUKIYAMA-KOHARA *et al.*, 2001). Diante disso, Lynch *et al.* (2002) avaliando o efeito da suplementação aguda com leucina em diferentes tecidos de ratos, verificaram que a suplementação de leucina estimulou a síntese proteica no tecido adiposo. A regulação da síntese proteica foi

fortemente correlacionada a alterações na fosforilação da S6K1 e 4EBP-1. Estes achados dão suporte aos dados referentes à gordura corporal, no entanto faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que expliquem os reais mecanismos de ação da leucina neste compartimento corporal.

A suplementação com BCAA não foi capaz de reverter a modulação mediada pela desnutrição proteica sobre o conteúdo de proteína e massa magra dos filhotes (Figura 6 B, D). Outros autores também não verificaram manutenção ou acréscimo da massa magra ou do conteúdo de proteína corporal mediados pela suplementação de leucina, em estados catabólicos (DONATO *et al.*, 2006). Vale destacar que, o aumento da taxa de síntese proteica não necessariamente resulta em acréscimo no conteúdo de proteína na carcaça, pois pode haver aumento paralelo da degradação proteica (AFOLABI *et al.*, 2004). Nesse sentido, mesmo que a suplementação com BCAA, sobretudo de leucina, tenha favorecido a síntese proteica, isso não foi suficiente para sobrepujar a condição catabólica, a ponto de preservar a quantidade de proteína corporal. Adicionalmente, estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que os efeitos da suplementação de leucina sobre a síntese proteica são dose-dependentes. Diante disso é sugerido que a dose de leucina capaz de causar efeitos máximos sobre a degradação proteica pode ser maior do que a necessária para causar efeitos máximos sobre a síntese de proteínas em condições de balanço nitrogenado negativo (PLATELL *et al.*, 2000; MATTHEWS, 2005). A quantidade suplementada de leucina no grupo BCAA foi 1,8 %. Embora a quantidade de leucina a ser suplementada em estudos experimentais ainda não esteja bem estabelecida, estudos conduzidos com ratos em estados catabólicos, que encontraram efeitos positivos em relação à massa magra e ao conteúdo de proteína corporal, utilizaram 3 % de suplementação de leucina (VENTRUCCI *et al.*, 2004, 2007). Dessa forma, uma hipótese que poderíamos sugerir é que a quantidade suplementada de leucina no grupo BCAA não foi suficiente para promover alterações no *turnover* proteico capazes de ter um impacto significativo sobre estes constituintes corporais. No entanto, não é possível afirmar isto com segurança, uma vez que nenhuma técnica que permita estimar a taxa de síntese e degradação proteica foi realizada.

O acúmulo de proteínas durante a prenhez é essencial para o crescimento fetal e, nessa fase, tanto a síntese de proteínas quanto a retenção de nitrogênio encontram-se aumentadas em ambos compartimentos: materno e fetal (SATISH, 2000). Nesse sentido, em nosso experimento foram avaliadas as concentrações séricas de albumina nas matrizes e nos filhotes (Figura 4 B e 8) e de proteínas totais nas matrizes (Figura 4 A). O protocolo de dieta restrita em proteína utilizado promoveu redução significativa de albumina e proteínas totais nas matrizes (Figura 4 A, B). O estado proteico visceral é frequentemente avaliado pela determinação da concentração de uma ou mais proteínas do soro (ex: albumina, transferrina, pré-albumina e proteína transportadora de retinol), cujo principal sítio de síntese é o fígado (CARLSON, 2000). Este órgão é um dos primeiros a ser afetado em um estado de desnutrição causado, por exemplo, pela deficiência de energia e/ou de proteínas. Em tais circunstâncias, a síntese destas proteínas pode ser reduzida e acarretar na diminuição das suas concentrações séricas (MARSHALL, 2000). Este fenômeno é uma resposta típica do organismo frente a uma redução na ingestão de alimentos, na qual as proteínas viscerais são degradadas em prol da preservação de proteínas musculares, o que explicaria os resultados encontrados em relação às concentrações reduzidas de albumina e proteínas totais séricas das matrizes. A ocorrência de hipoproteinemia e hipoalbuminemia, em consequência tanto da prenhez quanto da restrição protéica, pode ter contribuído também para a redução na massa dos fetos (Figura 5 A) (BALLEN *et al.*, 2009).

Embora a deficiência de proteína na dieta induza a hipoalbuminemia, as concentrações de albumina sérica dos filhotes de matrizes que receberam dieta restrita em proteína não foram alteradas (Figura 8). Neste contexto, poucas pesquisas avaliaram a implicação do transporte placentário de nutrientes em resposta à desnutrição protéica ao longo da gestação, porém alguns estudos verificaram que o sistema placentário responsável pelo transporte de aminoácidos, em ratos alimentados com dieta pobre em proteína, possui um mecanismo de regulação negativa, que eleva a atividade de sistemas transportadores de aminoácidos (Sistema A) em resposta à baixa concentração de aminoácidos da dieta, processo conhecido como regulação adaptativa (GAZZOLA *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2006). Contudo os sinais mediadores

desta regulação, em ratos alimentados com dieta pobre em proteína, não é conhecido. Aliado a isto, o balanço nitrogenado torna-se melhorado e a proteína da dieta é utilizada mais eficientemente no final da prenhez (MOJTAHED *et al.*, 2002). Neste período a mobilização das proteínas das matrizes seria otimizada a fim de suprir o aporte necessário de proteínas ao adequado crescimento e desenvolvimento fetal.

A dieta restrita em proteína pode ainda afetar negativamente o estado nutricional proteico por reduzir os conteúdos de proteína e RNA teciduais (ZARTARIAN, GALLER e MUNRO, 1980; EMERY, ROTHWELL e STOCK, 1983; POND, MAURER e KLINDT, 1991). No presente estudo, o grupo BCAA apresentou maior concentração de proteína e de RNA no fígado e no músculo gastrocnêmio (Figura 7 A, B) em comparação aos demais grupos. A concentração de RNA total é considerada um indicador da capacidade celular para síntese proteica. Assim, pode ser especulado que, o acréscimo da concentração de RNA muscular e hepático dos animais suplementados com BCAA aumentou a síntese proteica, uma vez que este aumento refletiu em maior concentração de proteína nestes tecidos. Também poderia ser especulado que esta suplementação contribuiu com a maior concentração de RNA no fígado e no músculo gastrocnêmio, ao estimular principalmente os mecanismos intracelulares envolvidos com a síntese de componentes que constituem o aparato responsável pelo processo de tradução proteica (LYNCH *et al.*, 2002; ESCOBAR *et al.*, 2005; DONATO *et al.*, 2006).

Nessa direção, observou-se aumento na fosforilação da proteína quinase mTOR no fígado de filhotes das matrizes que receberam a suplementação de BCAA (Figura 9 B), quando comparado ao grupo CON e AAE. Além disso, os grupos BCAA e VAL/ISO apresentaram maior expressão desta proteína no fígado (Figura 9 A). Por outro lado, a fosforilação de seus efetores *downstream* (S6K1 e 4EBP-1) não se diferenciou entre os grupos. A expressão das formas fosforiladas de S6K1 e 4EBP-1 é frequentemente utilizada como uma medida da atividade da via de sinalização da mTOR, deste modo pode-se sugerir que os efeitos sobre o acréscimo da síntese proteica poderiam estar sendo mediados por via independente da mTOR, ou pela sinalização desta proteína em outras cascatas biomoleculares, que estejam relacionadas à outras etapas do processo de síntese proteica como a

transcrição por exemplo, contudo pesquisas que avaliem os mecanismos de ação da suplementação com BCAA em diferentes vias de sinalização relacionadas ao estímulo da síntese de proteínas são necessárias.

Embora a desnutrição proteica prejudique o desenvolvimento muscular e hepático (ZARTARIAN, GALLER e MUNRO, 1980; REES *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2003) os constituintes, proteína e RNA, foram preservados nos grupos VAL/ISO e AAE, considerando que estes não se diferenciaram do grupo CON. Assim como constatado em relação à preservação das concentrações de albumina sérica, os conteúdos de proteína e RNA teciduais podem ter sido mantidos em decorrência de um mecanismo de *feed back* negativo, no qual ocorreria uma redistribuição do fluxo sanguíneo, a fim de preservar tecidos vitais, e aumento da atividade de transportadores placentários específicos, como de aminoácidos, por exemplo, para garantir a sobrevivência e o adequado desenvolvimento fetal. Aliado a isto, este efeito poderia ser mediado em função de um acréscimo no estímulo à síntese proteica desencadeado pela suplementação com estes aminoácidos, contudo o efeito da suplementação associada de valina e isoleucina, bem como de treonina, tirosina e lisina, até o presente momento ainda não havia sido testado. Neste contexto, verificou-se que a suplementação com os aminoácidos valina e isoleucina, quando fornecidos isoladamente, não promoveu efeito sobre a síntese proteica dos tecidos muscular e cardíaco e na via de sinalização da mTOR de porcos neonatos (ESCOBAR *et al.*, 2006).

Uma questão que poderia ser abordada está relacionada à inserção de um grupo submetido à desnutrição suplementado apenas com leucina, visando isolar o efeito desta suplementação e verificar se os efeitos encontrados com a suplementação de BCAA poderiam ser maximizados ou suprimidos. Esta intervenção foi testada em um experimento piloto em nosso laboratório, contudo foi constatado que as matrizes submetidas à desnutrição proteica no decorrer da gestação recebendo suplementação de 4 % de leucina na dieta, apresentavam redução significativa do consumo alimentar, sendo que a média do consumo diário de 12 matrizes ao longo da gestação foi de 8,8 g (dados não apresentados). Deste modo, as matrizes além de serem submetidas à desnutrição proteica também se encontravam em uma condição de restrição calórica. Considerando que o crescimento fetal é dependente especialmente da

nutrição materna, este estado catabólico pode ter influenciado fortemente o não desenvolvimento gestacional. De todas as matrizes apenas duas chegaram a dar à luz, sendo que em uma destas os filhotes foram natimortos, e que, a outra cometeu canibalismo de todos os filhotes.

Vale ressaltar ainda, sobre o antagonismo entre os BCAA, o qual pressupõe que a suplementação excessiva isolada de algum destes aminoácidos pode prejudicar a utilização dos demais BCAA (D'MELLO e LEWIS, 1970; HARPER, MILLER e BLOCK, 1984). Além disso, dietas restritas em proteína, contendo altas concentrações de leucina, promovem redução significativa de GPG (COHLAN e STONE, 1961), crescimento de ratos (HARPER, MILLER e BLOCK, 1984) e consumo alimentar (ALLEN e BAKER, 1972). Estes efeitos associados poderiam justificar o prejuízo observado no desenvolvimento gestacional das matrizes suplementadas com leucina. Nessa direção, a utilização do grupo BCAA nos permitiu constatar que as consequências negativas da suplementação isolada de leucina, em matrizes com desnutrição proteica, não são mantidas quando este aminoácido é fornecido concomitantemente à valina e isoleucina.

Outro ponto que merece ser destacado é que não houve um grupo submetido somente à desnutrição proteica, haja vista que o protocolo experimental adotado no presente estudo, foi capaz de reduzir significativamente a massa corporal e de órgãos (Figura 5), e os constituintes da composição corporal (umidade, proteína, gordura e massa magra) (Figura 6) nos grupos submetidos à desnutrição proteica e suplementados com VAL/ISO e com AAE, quando comparados ao grupo CON. Adicionalmente, a suplementação com BCAA demonstrou diferenças significativas na maior parte dos parâmetros investigados em relação aos demais grupos submetidos à desnutrição proteica. Nessa perspectiva, pode-se sugerir que não seria encontrado nenhum efeito adicional do grupo BCAA, além dos que foram observados em relação aos grupos VAL/ISO e AAE.

Em resumo, os resultados obtidos indicaram que a suplementação de BCAA reverteu parte do déficit observado no crescimento em neonatos provenientes de ratas que receberam dieta restrita em proteína no decorrer da gestação. Isto se torna relevante uma vez que estudos têm apontado que a RCIU é associada a alterações metabólicas, comportamentais e neuroendócrinas, que podem conduzir ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (MAIRESSE *et al.*, 2007).

7. CONCLUSÃO

A partir da presente pesquisa verificou-se que:

- O crescimento fetal está intimamente ligado à disponibilidade de aminoácidos a partir da dieta materna, tendo em vista que o protocolo adotado de dieta materna restrita em proteína afetou de forma consistente os grupos submetidos à restrição proteica materna e que foram suplementados com VAL/ISO e AAE;
- As suplementações com VAL/ISO e AAE não são suficientes para recuperar os efeitos induzidos pela restrição protéica no decorrer da gestação;
- A suplementação com BCAA, foi capaz de minimizar ou mesmo de restaurar plenamente diversos parâmetros como:
 - a) massa da carcaça e de órgãos (coração, baço, rins, intestino e pâncreas);
 - b) conteúdo de gordura da carcaça;
 - c) concentrações de proteína e RNA hepáticas e musculares;
- A suplementação com BCAA estimulou a ativação da via de sinalização intercedida pela mTOR, por meio do aumento da fosforilação desta proteína, permitindo sugerir que estes atuam como reguladores do crescimento fetal, possivelmente por influenciar vias de sinalização, além de atuarem como substratos diretos para a síntese protéica, porém os reais mecanismos estimulatórios promovidos por estes em vias moleculares necessitam ser melhores estabelecidos.

Partindo da premissa de que o inadequado crescimento fetal está vinculado ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta, estudos que avaliem os efeitos mediados por esta suplementação em proles submetidas à dieta restrita em proteína no decorrer da gestação, nesta fase da vida são necessários.

8. REFERÊNCIAS

AFOLABI, P.R; JAHOOR, F; GIBOSN, N.R; JACKSON, A.A. Response of hepatic proteins to the lowering of habitual dietary protein to the recommended safe level of intake. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 287:E327-30, 2004.

ALLEN, N.K; BAKER, D.H. Quantitative efficacy of dietary isoleucine and valine for chick growth as influenced by variable quantities of excess dietary leucine. **Poult. Sci.** 51:1292-8, 1972.

ANTHONY, J.C; ANTHONY, T.G; LAYMAN, D.K. Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. **J. Nutr.** 129:1102-6, 1999.

ANTHONY, J.C; YOSHIZAWA, F; ANTHONY, T.G; VARY, T.C; JEFFERSON, L.S; KIMBALL, S.R. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. **J. Nutr.** 130:2413-9, 2000a.

ANTHONY, J.C; ANTHONY, T.G; KIMBALL, S.R; VARY, T.C; JEFFERSON, L.S. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. **J. Nutr.** 130:139-45, 2000b.

ANTHONY, J.C; LANG, C.H; CROZIER, S.J; ANTHONY, T.G; MACLEAN, D.A; KIMBALL, S.R; JEFFERSON, L.S. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 282:E1092-101, 2002.

BAKER, D.H. Tolerance for branched-chain amino acids in experimental animals and humans. **J. Nutr.** 135:1585S-1590S, 2005.

BARKER, D.J. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *Br. Med. Bull.* 53:96-108, 1997.

BUDGE, H; GNANALINGHAM, M.G; GARDNER, D.S; MOSTYN, A; STEPHENSON, T; SYMONDS, M.E. Maternal nutritional programming of fetal adipose tissue development: long-term consequences for later obesity. **Birth Defects Res. C. Embryo. Today** 75:193-9, 2005.

BUSE, M.G; REID, S.S. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. **J. Clin. Invest.** 56:1250-61, 1975.

CARLSON, T. Laboratory data in nutrition assessment. In: MAHAN, L.K., SCOTT-STUMP, S. **Krause's food, nutrition and diet therapy**. 10.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. p.380-98.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Unicamp, 1999. p.37-77, 87-96.

COHLAN, S.Q; STONE, S.M. Effects of dietary and intraperitoneal excess of L-lysine and L-leucine on rat pregnancy and offspring. **J. Nutr.** 74:93-5, 1961.

DESAI, M; CROWTHER, N.J; LUCAS, A; HALES, C.N. Organ-selective growth in the offspring of protein restricted mothers. **Br. J. Nutr.** 76:591-603, 1996.

DESAI, M; GAYLE, D; BABU, J; ROSS, M.G. Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 193:1224-32, 2005.

D'MELLO, J.P.F; LEWIS, D. Amino acid interactions in chick nutrition. 2. The interrelationship between leucine, isoleucine, and valine. **Br. Poult. Sci.** 11:313-23, 1970.

DONATO, J.J; PEDROSA, R.G; CRUZAT, V.F; PIRES, I.S.O; TIRAPEGUI, J. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. **Nutrition** 22:520-7, 2006.

DONATO, J.J; PEDROSA, R.G; ARAÚJO, J.A.J; PIRES, I.S.O; TIRAPEGUI, J. Effects of leucine and phenylalanine supplementation during intermittent periods of food restriction and refeeding in adults rats. **Life Sci.** 81:31-9, 2007.

DOUMAS, B.T; WATSON, W.A; BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clin. Chim. Acta.** 31:87-96, 1971.

DU, F; HIGGINBOTHAM, D.A; WHITE, B.D. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. **J. Nutr.** 130:514-21, 2000.

EMERY, P.W; ROTHWELL, N.J; STOCK, M.J. Protein synthesis in liver, skeletal muscle, and brown adipose tissue of rats fed a protein-deficient diet. **Biosci. Rep.** 3:569-75, 1983.

ESCOBAR, J; FRANK, J.W; SURYAWAN, A; NGUYEN, H.V; KIMBALL, S.R; JEFFERSON, L.S; DAVIS, T.A. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched chain amino acids in neonatal pigs. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 290:E612-E621, 2006.

FALL, C.H; OSMOND, C; BARKER, D.J; CLARK, P.M; HALES C.N; STIRLING, Y; MEADE, T.W. Fetal and infant growth and cardiovascular risk factors in women. **BMJ** 310:428-32, 1995.

FALL, C.H; YAJNIK, C.S; RAO, S; DAVIES, A.A; BROWN, N; FARRANT, H.J. Micronutrients and fetal growth. **J. Nutr.** 133:1747-56, 2003.

FLEMING, J.V; HAY, S.M; HARRIES, D.N; REES, W.D. The effects of nutrient deprivation and differentiation on the expression of growth arrest genes (gas and gadd) in F9 embryonal carcinoma cells. **Biochem. J.** 330:573-9, 1998.

GARLICK, P.J; GRANT, I. Amino acid infusion increases the sensitivity of muscle protein synthesis in vivo to insulin. Effect of branched-chain amino acids. **Biochem. J.** 254:579-84, 1988.

GARLICK, P.J. The role of leucine in the regulation of protein metabolism. **J Nutr.** 135:1553S-6S, 2005.

GAZZOLA, R.F; SALA, R; BUSSOLATI, O; VISIGALLI, R; DALL'ASTA, V; GANAPATHY, V; GAZZOLA, G.C. The adaptative regulation of amino acid transport sytem A is associated to changes in ATA2 expression. **FEBS Lett.** 490:11-4, 2001.

GURMINI, J; CECÍLIO, W.A.C; SCHULER, S.L; OLANDOSKI, M; NORONHA, L. Desnutrição intrauterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 41:271-8, 2005.

HARLOW, E; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1988.

HARPER, A.E; MILLER, R.H; BLOCK, K.P. Branched-chain amino acid metabolism. **Annu. Rev. Nutr.** 4:409-54, 1984.

HENRY, R.J. **Clinical Chemistry - Principles and Technics**, 2^a Ed. Harper and Row, 1974.

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).** 107:37-45, 2004.

HINAULT, C; VAN OBBERGHEN, E; MOTHE-SATNEY, I. Role of amino acids in insulin signaling in adipocytes and their potential to decrease insulin resistance of adipose tissue. **J. Nutr. Biochem.** v.17, p.374-378, 2006.

HUIZINGA, C.T; ENGELBREGT, M.J; REKERS-MOMBARG, L.T; VAESSEN, S.F; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H.A; FODOR, M. Ligation of the uterine artery and early postnatal food restriction – animal models for growth retardation. **Horm. Res.** 62:233-40, 2004.

JANSSON, N; PETTERSSON, J; HAAFIZ, H; ERICSSON, A; PALMBERG, I; TRANBERG, M. GANAPATHY, V; POWELL, T.L; JANSSON, T. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. **J. Physiol.** 576:935-46, 2006.

JONES, H.N; ASHWORTH, C.J; PAGE, K.R; McARDLE, H.J. Expression and adaptative regulation of amino acid transport system A in a placental cell line under amino acid restriction. **Reproduction** 131:951-60, 2006.

KARLSSON, H.K.R; NILSSON, P; NILSSON, J; CHIBALIN, A.V; ZIERATH, J.R; BLOMSTRAND, E. Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 287:E1–E7, 2004.

KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Molecular mechanisms through which amino acids mediate signaling through the mammalian target of rapamycin. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care** 7:39-44, 2004.

KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. **J. Nutr.** 136:227–31, 2006.

LANDGRAF, M.A.V; MARTINEZ, L.L; RASTELLI, V.M.F; FRANCO, M.C.P; SOTO-SUAZO, M; TOSTES, R.C.A; CARVALHO, M.H.C; NIGRO, D; FORTES, Z.B. Intrauterine undernutrition in rats interferes with leukocyte migration, decreasing adhesion molecule expression in leukocytes and endothelial cells. **J. Nutr.** 135:1480–5, 2005.

LANGLEY-EVANS, S.C; WELHAM, S.J; SHERMAN, R.C; JACKSON, A.A. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. **Clin. Sci.** 91:607-15, 1996.

LANGLEY-EVANS, S.C. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. **Proc. Nutr. Soc.** 60:505–13, 2001.

LI, J.B; JEFFERSON, L.S. Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta.** 544:351-9, 1978.

LYNCH, C.J; FOX, H.L; VARY, T.C; JEFFERSON, L.S; KIMBALL, S.R. Regulation of amino acid-sensitive TOR signaling by leucine analogues in adipocytes. **J. Cell. Biochem.** 77:234-51, 2000.

LYNCH, C. J; PATSON, B.J; ANTHONY, J; VAVAL, A; JEFFERSON, L.S; VARY, T.C. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 283:E503-13, 2002.

LOWRY, D.H; ROSEBROUGH, J.N; FARR, A.L; RANDAL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193:266-75, 1951.

MAIRESSE, J; LESAGE, J; BRETON, C; BRÉANT, B; HAHN, T; DARNAUDÉRY, M; DICKSON, S.L; SECKL, J; BLONDEAU, B; VIEAU, D; MACCARI, S; VILTART, O. Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 292:1526–33, 2007.

MALANDRO, M.S; BEVERIDGE, M.J; KILBERG, M.S; NOVAK, D.A. Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation. **Pediatr. Res.** 34:439-42, 1996.

MARSHALL, W.J. The liver. In: **Clinical chemistry**. 4.ed. Edinburgh: Mosby, 2000. p.77-93.

MATTHEWS, D.E. Observations of branched-chain amino acid administration in humans. **J Nutr**, v. 135, p. 1580S-4S, 2005.

McARDLE, H.J; ANDERSEN, H.S; JONES, H; GAMBLING, L. Fetal programming: causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats – a review. **Placenta** 27:56-60, 2006.

MOJTAHEDI, M; GROOT, L.C.P.G.M; BOEKHOLT, H.A; RAAIJ, J.M.A. Nitrogen balance of healthy dutch women before and during pregnancy. **Am. J. Clin. Nutr.** 75:1078-83, 2002.

MUNRO, N.N.; FLECK, A. The determination of nucleic acids. **Methods Biochem. Anal.** 14:113-76, 1966.

NAISMITH, D.J; MORGAN, B.L.G. The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat. **Br. J. Nutr.** 36:563–6, 1976.

BALLEN, M.L.O; MORETTO, V.L; DOS SANTOS, M.P; GONÇALVES, T.S.S.; KAWASHITA, N,H; STOPPIGLIA, L.F; MARTINS, M.S.F; GOMES-DA-SILVA, M.H.G. Restrição protéica na prenhez – efeitos relacionados ao metabolismo materno. **Arg. Bras. Endocrinol. Metab.** 53:87-94, 2009.

O'CONNOR, P.M.J; KIMBALL, S.R; SURYAWAN, A; BUSH, J.A; NGUYEN, H.V; JEFFERSON, L.S; DAVIS, T.A. Regulation of translation initiation by insulin and amino acids in skeletal muscle of neonatal pigs. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 258:E40-E-53, 2003.

OZANNE, S.E; HALES, C.N. The long term consequences of intra-uterine protein malnutrition on glucose metabolism. **Proc. Nutr. Soc.** 58:615-9, 1999.

OZANNE, S.E; LEWIS, R; JENNINGS, B.J; HALES, C.N. Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. **Clin. Sci.** 106:141-5, 2004.

PARK, K.S; KIM, S.K; KIM, M.S; CHO, E.Y; LEE, J.H; LEE, K; PAK, Y.K; LEE, H.K. Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. **J. Nutr.** 133:3085–90, 2003.

PEDROSA, R.G., TIRAPEGUI J, ROGERO M.M., CASTRO I.A., PIRES I.S.O., SALGADO M.M., UEDA M. Assessment of the nutritional status of rats submitted to food restriction and/or to physical exercise. **Nutr. Res.**, v. 24, p.923-34, 2004.

PLATELL, C; KONG, S.E; MCCAULEY, R; HALL, J.C. Branched-chain amino acids. **J. Gastroenterol. Hepatol.** 15:706-17, 2000.

POND, W.G; MAURER, R.R; KLINDT, J. Fetal organ response to maternal protein deprivation during pregnancy in swine. **J. Nutr.** 121:504-9, 1991.

RAVELLI, G.P; STEIN, Z.A; SUSSER, M.W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N. Engl. J. Med.** 295:349-53, 1976.

REES, W.R; HAY, S.M; BUCHAN, V; ANTIPATS, C; PALMER, R.M. The effects of maternal protein restriction on the growth of the rat fetus and its amino acid supply. **Br. J. Nutr.** 81:243-50, 1999.

REES, W.D; HAY, S.M; CRUICKSHANK, M; REUSENS, B; REMACLE, C; ANTIPATIS, C; GRANT, G. Maternal protein intake in the pregnant rat programs the insulin axis and body composition in the offspring. **Metabolism** 55:642-9, 2006.

REEVES, P.G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J. Nutr.** 127:838-41, 1997.

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-76A rodent diet. **J. Nutr.** 123:1939-51, 1993.

REMESAR, X; LOPEX-TEJERO, D; PASTOR-ANGLADA, M. Some aspects of amino acid metabolism in the rat fetus. **Comp. Biochem. Physiol.** 88:719–25, 1987.

RICH-EDWARDS, J.W; STAMPFER, M.J; MANSON, J.E; ROSNER, B; HANKINSON, S.E; COLDITZ, G.A; WILLET, W.C; HENNEKENS, C.H. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. **BMJ** 315:396-400, 1997.

ROOS, S; JANSSON, N; PALMBERG, I; SÄLJÖ, K; POWELL, T.L; JANSSON, T. Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. **J. Physiol.** 582:449–59, 2007.

ROSSO, P; KAVA, R. Effects of food restriction on cardiac output and blood flow to the uterus and placenta in the pregnant rat. **J. Nutr.** 110, 2350–4, 1980.

ROTHWELL, N. J; STOCK, M.J. Influence of carbohydrate and fat intake on diet-induced thermogenesis and brown fat activity in rats fed low protein diets. **J. Nutr.** 117:1721–6, 1987.

SATISH, C.K. Protein metabolism in pregnancy. **Am. J. Clin. Nut.** 71:S1249-55, 2000.

SAUBERLICH, H.E. Studies on the toxicity and antagonism of amino acids for weanling rats. **J. Nutr.** 75:61-72, 1961.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989, p. 174-184.

SHIMOMURA, Y; HARRIS, R.A. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1. **J. Nutr.** 136:232S–233S, 2006.

SPECTER, S.E; HAMILTON, J.S; STERN, J.S; HORWITZ, B.A. Chronic protein restriction does not alter energetic efficiency of brown adipose tissue thermogenic capacity in genetically obese (fa/fa) Zucker rats. **J. Nutr.** 125:2183–2193, 1995.

STIPANUK, M.H. Leucine and Protein Synthesis: mTOR and Beyond. **Nut. Rev.** 65:122-129, 2007.

TAYLOR, P.D; POSTON, L. Developmental programming of obesity in mammals. **Exp. Physiol.** 92:287-98, 2007.

TORRENS, C; KELSALL, C.J; HOPKINS, L.A; ANTHONY, F.W; CURZEN, N.P; HANSON, M.A. Atorvastatin restores endothelial function in offspring of protein-restricted rats in a cholesterol-independent manner. **Hypertension** 53:661-7, 2009.

TSUKIYAMA-KOHARA, K; POULIN, F; KOHARA, M; DEMARIA, C.T; CHENG, A; WU, Z; GINGRAS, A.C; KATSUME, A; ELCHEBLY, M; SPIEGELMAN, B.M; HARPER, M.E; TREMBLAY, M.L; SONENBERG, N. Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. **Nat. Med.** 7:1128-32, 2001.

VENTRUCCI, G; MELLO, M.A; GOMES MARCONDES, M.C. Effect of a leucine-supplemented diet on body composition changes in pregnant rats bearing Walker 256 tumor. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 34:333-8, 2001.

VENTRUCCI, G; MELLO, M.A; GOMES MARCONDES, M.C. Effects of leucine supplemented diet on intestinal absorption in tumor bearing pregnant rats. **BMC Cancer** 2:7, 2002.

VENTRUCCI, G; SILVA, L.G.R; MELLO, M.A.R; GOMES MARCONDES, M.C. Effects of a leucine-rich diet on body composition during nutritional recovery in rats. **Nutrition** 20:213-7, 2004.

VENTRUCCI, G; MELLO, M.A.R; GOMES-MARCONDES, M.C.C. Leucine-rich diet alters the eukaryotic translation initiation factors expression in skeletal muscle of tumour-bearing rats. **B.M.C. Cancer** 7:1-11, 2007.

VICKERS, M.H; IKENASIO, B.A; BREIER, B.H. IGF-I Treatment reduces hyperphagia, obesity and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming. **Endocrinology** 142:3964-3973, 2001.

VOLPI, E; KOBAYASHI, H; SHEFFIELD-MOORE, M; MITTENDORFER, B; WOLFE, R.R. Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. **Am. J. Clin. Nutr.** 78:250-8, 2003.

WEBSTER, A.J.F. Energy partitioning, tissue growth and appetite control. **Proc. Nutr. Soc.** 52:69–76, 1993.

YANG, O; GUAN, K.L. Expanding mTOR signaling. **Cell. Res.** 17:666-681, 2007.

ZAMBRANO, E; BAUTISTA, C.J; DEÁS, M; MARTÍNEZ-SAMOYOA, P.M; GONZÁLES-ZAMORANO, M; LEDESMA, H; MORALES, J; LARREA, F; NATHANIELSZ, P.W. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. **J. Physiol.** 571:221-33, 2006.

ZANCHI, N.E; NICASTRO, H; LANCHI, A.H.JR. Potential antiproteolytic effects of L-leucine: observations of in vitro and in vivo studies. **Nutr. Metab. (Lond).** 5:20, 2008.

ZARTARIAN, G.N; GALLER, J.R; MUNRO, H.N. Marginal protein deficiency in pregnant rats. I. Changes in maternal body composition. **J. Nutr.** 110:1291-7, 1980.

ZHU, M.J; FORD, S.P; NATHANIELSZ, P.W; DU, M. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. **Biol. Reprod.** 71:1968-73, 2004.

ANEXOS

Anexo 1	Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado
Anexo 2	Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP
Anexo 3	Ficha do aluno
Anexo 4	Currículo <i>lattes</i>
Anexo 5	Artigos aprovados em revistas científicas (aceitos e no prelo)

ANEXO 1. Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.
 - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
 - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Uma cópia da ata de defesa será encartada na versão definitiva do trabalho, que será depositada na biblioteca.
6. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 21 de março de 2005.

Profa. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Presidente da CPG/PRONUT/USP

ANEXO 2. Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Ofício CEEA nº 61/2007

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Efeitos da suplementação de leucina em proles de fêmeas submetidos à desnutrição protéica durante a gestação” (Protocolo CEEA nº158), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Gabriela Fullin Resende Teodoro** sob a orientação do(a) Prof(a). **Júlio Orlando Tirapegui Toledo**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 10/12/2007.*

São Paulo, 11 de dezembro de 2007.

Prof. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

ANEXO 3. Ficha do aluno

9132 - 5840984/1 - Gabriela Fullin Resende Teodoro

Email: gabynut@usp.br

Data de Nascimento: 12/04/1984

Cédula de Identidade: RG - 12.583.721 - MG

Local de Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Nutricionista - Centro Universitário Filadélfia - Brasil - 2005

Curso: Mestrado

Programa: Ciência dos Alimentos

Área: Nutrição Experimental

Data de Matrícula: 06/07/2007

Início da Contagem de Prazo: 06/07/2007

Data Limite: 06/05/2010

Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco -

06/07/2007 a 16/08/2007 E.Mail: bfranco@usp.br

Orientador: Prof(a). Dr(a). Julio Orlando Tirapegui Toledo - 17/08/2007 até o presente. E.Mail: tirapegu@usp.br

Prorrogação: 120 dias
Período de 06/01/2010 a 06/05/2010

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 29/06/2009

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 06/07/2007
Prorrogação em 24/11/2009
Matrícula de Acompanhamento em 13/02/2010

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/02/2010

Impresso em: 06/05/10 07:43:38

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 5840984/1 - Gabriela Fullin Resende Teodoro

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
HNT5707-3/2	Métodos para Avaliação do Estado Nutricional de Populações (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	30/07/2007	02/09/2007	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
NHA5701-3/4	Fundamentos Biológicos da Nutrição Humana Aplicada (Curso Interunidades: Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo)	06/08/2007	14/10/2007	120	8	90	A	N	Concluída
FBA5901-1/1	Tópicos Avançados em Nutrigenômica Saúde Perinatal (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	29/10/2007	02/12/2007	30	2	100	A	N	Concluída
HSM5708-6/2	Seminários em Ciência dos Alimentos e Nutrição	01/04/2008	09/06/2008	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBA5870-5/4	Trabalhos Científicos: da	06/05/2008	16/06/2008	60	4	100	A	N	Concluída

	Elaboração à Publicação								
FBA5728- 2/7	Aprimoramento Didático	06/05/2008	02/06/2008	60	0	0	-	N	Pré- matrícula indeferida
MCM5872- 1/1	Fundamentos da Redação e Apresentação de Trabalhos Científicos (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	12/05/2008	18/05/2008	30	0	0	-	N	Pré- matrícula indeferida
NHA5705- 2/1	Fundamentos da Biologia Molecular Aplicados à Nutrição Humana (Curso Interunidades: Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo)	27/05/2008	30/06/2008	60	4	100	A	N	Concluída
HNT5709- 4/2	Dietas e Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	03/08/2008	14/09/2008	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBA5728- 2/8	Aprimoramento Didático	07/10/2008	03/11/2008	60	4	87	A	N	Concluída

Disciplinas:	25	25	26
Total:	25	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Anexo 4. Currículo *Lattes*

Gabriela Fullin Resende Teodoro

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Gabriela Fullin Resende Teodoro
Nome em citações bibliográficas TEODORO, G. F. R.
Sexo feminino

Filiação Pedro Teodoro Rodrigues de Resende e Neire Aparecida Fullin
Nascimento 12/04/1984 - Uberaba/MG - Brasil
Carteira de Identidade 12583721 ssp - MG - 18/09/1999
CPF 06667169607

Endereço residencial Rua Iquiririm
 Vila Indiana - São Paulo
 05586-001, SP - Brasil

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências
 Farmacêuticas
 Avenida Professor Lineu Prestes, nº 580. Bl: 14
 Cidade Universitária - São Paulo
 05508-900, SP - Brasil
 Telefone: 11 30913309

URL da home page: <http://>

Endereço eletrônico

e-mail para contato : gabynut@usp.br
 e-mail alternativo : gabyusp@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

- 2007** Mestrado em Ciências dos Alimentos.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Efeitos da suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada em proles de fêmeas submetidas a desnutrição protéica materna
 Orientador: Julio Orlando Tirapegui Toledo
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: Leucina, Valina, Isoleucina, Desnutrição, mTOR
Áreas do conhecimento : Bioquímica da Nutrição
Setores de atividade : Saúde e Serviços Sociais
- 2006 - 2007** Especialização em Nutrição e Metabolismo na Prática Clínica.
 Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
 Título: Obesidade na Infância e Adolescência: uma revisão da literatura
 Orientador: Sílvia Justina Papini-Berto
- 2002 - 2005** Graduação em Nutrição.
 Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Londrina, Brasil
 Título: Análise das alterações metabólicas em pacientes HIV positivos - uma revisão da literatura
 Orientador: Clísia Mara Carreira

Formação complementar

2009 - 2009	Curso de curta duração em Tecnologia Multiplex. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2008 - 2008	Epidemiologia da obesidade no Brasil. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2006 - 2006	Nutrição aplicada à prática esportiva. Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
2006 - 2006	Bioestatística. Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Curso Internac. de Nutrição Parenteral e Enteral. Ganep Nutrição Humana, GANEP, Sao Paulo, Brasil <i>Palavras-chave: Nutrição Parenteral e Enteral</i>
2004 - 2004	Curso de curta duração em Nutrição Aplicada ao Exercício e ao Esporte. Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Reaproveitamento de Alimentos. Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Londrina, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta duração em Gestação, amamenta�o e cuidados com o neonato. Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Londrina, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta dura�o em Carotenóides: fun�o�es, fontes e altera�o�es.... Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Londrina, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta dura�o em Benefícios da soja e organismos transg�nicos. Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Londrina, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta dura�o em Dietas e Sistemas de Equivalência para Diabetes. Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Londrina, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta dura�o em Segurança Alimentar e Nutricional e o Programa.... Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Londrina, Brasil
2002 - 2002	Curso de curta dura�o em A importância da Gordura na Alimenta�o. Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Londrina, Brasil
2002 - 2002	Curso de curta dura�o em Interpreta�o de Exames Laboratoriais. Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Londrina, Brasil
2002 - 2002	Curso de curta dura�o em Seq�enciaram o genoma humano... e agora?.. Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Londrina, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

- 2009 - Atual** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estágio docência , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Programa de Aperfeiçoamento de Ensino. Disciplina de Bromatologia Básica. Curso de Graduação: Nutrição. Campus da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF)-USP.
- 2007 - Atual** Vínculo: bolsista mestrando , Enquadramento funcional: Discente de Pós Graduação, Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

- 2007 - Atual** Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Participação em projetos:
Efeitos da suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada em proles de fêmeas submetidas a desnutrição protéica materna
- 07/2007 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Linhas de Pesquisa:
Nutrição experimental, desnutrição protéica materna, crescimento e desenvolvimento fetal

2. Centro de Estudos Superiores de Londrina - CESULON

Vínculo institucional

- 2006 - 2006** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Nutricionista Training , Carga horária: 24, Regime: Parcial
Outras informações:
Personal Training Nutricional na Clínica de Nutrição- CEPS (Órgão Suplementar do Centro Universitário Filadélfia).
- 2005 - 2005** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Monitoria , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitora do Laboratório de Nutrição e Dietética do Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL).
- 2005 - 2006** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Nutricionista , Carga horária: 24, Regime: Parcial
Outras informações:
Atendimento ambulatorial na Clínica de Educação para Saúde (Ceps) do Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL).
- 2004 - 2005** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Pesquisa e Desenvolvimento , Carga horária: 8, Regime: Parcial

Atividades

02/2006 - 04/2006 Treinamento, Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Especificação:

Personal Training Nutricional na Clínica de Educação para Saúde (CEPS)

12/2005 - 07/2006 Serviço Técnico Especializado, Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Especificação:

Atendimento Ambulatorial na Clínica de Educação para Saúde - CEPS

02/2005 - 06/2005 Treinamento, Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Especificação:

Monitoria do Laboratório de Nutrição e Dietética, em dois eventos científicos realizados em 2005.

2004 - 2004

Projetos de pesquisa, Centro Universitário Filadélfia

Participação em projetos:

Projeto de Pesquisa: Intervenção Nutricional para tratamento de Anemia e Colesterolemia entre crianças e adolescentes assistidos em dois CAIC'S (Centro Integrado a Criança e Adolescente) Londrina Pr.

08/2004 - 12/2005 Projetos de pesquisa, Centro Universitário Filadélfia

Participação em projetos:

Projeto de Pesquisa: Prevenção e Tratamento das Alterações Músculo-Esqueléticas e Metabólicas de Pacientes Portadores de HIV/AIDS.

3. Colégio Londrinense - LONDRINENSE

Vínculo institucional

2005 - 2005

Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Palestrante, Regime: Parcial

Outras informações:

Palestra ministrada intitulada "Alimentação Saudável na Adolescência" para alunos no ensino fundamental deste estabelecimento de ensino.

4. Gran Sapore BR Brasil S.A. - GRAN SAPORE

Vínculo institucional

2004 - 2005

Vínculo: Estágio extracurricular , Enquadramento funcional: Nutricionista , Carga horária: 8, Regime: Parcial

Atividades

08/2004 - 12/2005 Estágio, Gran Sapore BR Brasil S.A.

Estágio:

Estágio extra curricular em empresa de alimentação coletiva

5. SESC Paraná - SESC

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Posto de orientação, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Posto de orientação sobre Alimentação Saudável no evento "Saúde em Foco".

6. Universidade Estadual de Londrina - UEL

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Pesquisador , Carga horária: 8, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Integrou o Grupo de Estudo e Pesquisa em Metabolismo, Nutrição e Exercício (GEPEMENE). Participou durante este período como colaboradora de pesquisas que eram realizadas pelo Grupo, e de discussões sobre temas relevantes na área, nas reuniões científicas.

Linhas de pesquisa

1. Nutrição experimental, desnutrição protéica materna, crescimento e desenvolvimento fetal

Objetivos: Avaliar o efeito da suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada em proles de fêmeas submetidas à desnutrição protéica durante a gestação.

Palavras-chave: Desnutrição protéica, Leucina, Valina, Isoleucina, mTOR

Áreas do conhecimento : Desnutrição e Desenvolvimento Fisiológico, Bioquímica da Nutrição

Projetos

2007 - Atual Efeitos da suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada em proles de fêmeas submetidas a desnutrição protéica materna

Descrição: Estudos em animais mostram que a desnutrição protéica intra-uterina pode acarretar redução no crescimento de determinados órgãos e tecidos e provocar modificações permanentes em suas estruturas afetando o metabolismo. Esse fenômeno pode parcialmente ser explicado pela hipótese da programação fetal, na qual é sugerido que ocorra uma adaptação metabólica e fisiológica do feto a uma condição intra-uterina adversa, que pode induzir o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta. Estudos com suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), sobretudo com leucina, têm verificado a capacidade desses nutrientes promoverem a síntese protéica mesmo em condições catabólicas, por meio da ativação de uma via bioquímica intracelular intercedida pela proteína quinase Alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR). Desse modo o objetivo do projeto é avaliar o efeito da suplementação de BCAA em ratos cujas mães foram submetidas a restrição protéica no decorrer da gestação. Após o nascimento os filhotes serão eutanasiados para análise dos parâmetros que serão investigados: teciduais (concentração de proteína, de RNA e DNA do fígado e do músculo gastrocnêmio), séricos (concentração de proteínas totais, albumina e IGF-1), moleculares (expressão total e em estado fosforilado da proteína ribossomal S6 quinase 1 (S6K1), da proteína ligadora 1 do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1) e da mTOR, e composição química da carcaça (umidade, proteínas e lipídeos).

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (3); Doutorado (1);

Integrantes: Gabriela Fullin Resende Teodoro (Responsável); ;

Financiador(es):

2004 - 2005 Projeto de Pesquisa: Prevenção e Tratamento das Alterações Músculo-Esqueléticas e Metabólicas de Pacientes Portadores de HIV/AIDS.

Descrição: Projeto de Extensão "Prevenção e tratamento das alterações músculo-esqueléticas e metabólicas de pacientes portadores de HIV/AIDS" realizado no período de agosto de 2004 a dezembro de 2005, com carga horária de 35 horas nesta instituição.

Situação: Concluído Natureza: Extensão

Alunos envolvidos: Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: Gabriela Fullin Resende Teodoro; Clisia Mara Carrera (Responsável)

Financiador(es):

2004 - 2004 Projeto de Pesquisa: Intervenção Nutricional para tratamento de Anemia e Colesterolemia entre crianças e adolescentes assistidos em dois CAIC'S (Centro Integrado a Criança e Adolescente) Londrina Pr.

Descrição: Projeto de Pesquisa: Intervenção Nutricional para tratamento de Anemia e Colesterolemia entre crianças e adolescentes assistidos em dois CAIC'S (Centro Integrado a Criança e Adolescente) em Londrina Pr. realizado no ano de 2004, com carga horária de 90 horas

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (15); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (1);

Integrantes: Gabriela Fullin Resende Teodoro; Ivoneti Barros Nunes de Oliveira (Responsável)

Financiador(es):

Áreas de atuação

1. Desnutrição e Desenvolvimento Fisiológico
2. Bioquímica da Nutrição

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Espanhol Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. TEODORO, G. F. R., Vianna, D., TORRES-LEAL, F.L., TIRAPEGUI, J.

Programação fetal: alterações no ambiente intra-uterino e consequências em longo prazo.. Nutrição em Pauta. , v.17, p.39 - 42, 2009.

Palavras-chave: Programação Fetal, Nutrição materna, Peso ao nascer

Referências adicionais : Português. Meio de divulgação: Impresso

2. Vianna, D., TEODORO, G. F. R., TIRAPEGUI, J.

Leucina: Novo modulador no processo de síntese protéica?. *Nutrição em Pauta.* , v.16, p.12 - 15, 2008.

Palavras-chave: Leucina, mTOR, Síntese Protéica

Áreas do conhecimento : Bioquímica da Nutrição

Referências adicionais : Português. Meio de divulgação: Vários, Home page: [http://www.nutricaoempauta.com.br/lista_artigo.php?cod=815]

Artigos aceitos para publicação

1. TORRES-LEAL, F.L., Vianna, D., TEODORO, G. F. R., CAPITANI, M. D., TIRAPEGUI, J.

Aspectos do aminoácido de cadeia ramificada leucina no controle glicêmico e na resistência à insulina. *Nutrire (São Paulo).* , 2010.

Referências adicionais : Português.

2. Vianna, D., TEODORO, G. F. R., TORRES-LEAL, F.L., TIRAPEGUI, J.

Regulation of protein synthesis by leucine. *RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* , 2010.

Referências adicionais : Inglês.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. TEODORO, G. F. R., Donato Jr., J., Vianna, D., TORRES-LEAL, F.L., PIRES, I.S., TIRAPEGUI, J.

Efeitos da suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada sobre a composição corporal em proles de fêmeas submetidas a desnutrição protéica materna In: XV Congresso Latinoamericano de Nutrición - SLAN 2009, XVI Jornadas de la Sociedad Chilena de Nutrición, 2009, Santiago.

Revista Chilena de Nutrición. , 2009. v.36. p.528 - 528

Referências adicionais : Chile/Português. Meio de divulgação: Impresso

2. TEODORO, G. F. R., TORRES-LEAL, F.L., FONSECA-ALANIZ, M., Vianna, D., PIRES, I.S., CAPITANI, M., Pantaleão, L.C., Donato Jr., J., Rogero, M.M., Lima, F.B., TIRAPEGUI, J.

Effect of leucine and exercise on fat and metabolism of glucose in previously obese rats In: ACSM 56th Annual Meeting Final Program, 2009, Seattle.

Medicine & Science in Sports & Exercise. , 2009. v.41. p.S423 - S423

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês.

3. TEODORO, G. F. R., Donato Jr., J., Vianna, D., TORRES-LEAL, F.L., TIRAPEGUI, J.

Effects of BCAA supplementation on offsprings submitted to maternal protein restriction In: 19th International Congress of Nutrition, 2009, Bangkok.

Annals of Nutrition and Metabolism. , 2009. v.55. p.498 - 498

Referências adicionais : Tailândia/Inglês. Meio de divulgação: Vários, Home page: [http://www.karger.com/anm]

4. TORRES-LEAL, F.L., FONSECA-ALANIZ, M., Vianna, D., TEODORO, G. F. R., TIRAPEGUI, J.

Insulin resisten rats make higher deposition of fat with leucine supplementation after exercise. In: 19th International Congress of Nutrition, 2009, Bangkok.

Annals of Nutrition and Metabolism. , 2009. v.55. p.609 - 609

Referências adicionais : Tailândia/Inglês. Meio de divulgação: Vários, Home page: [http://www.karger.com/anm]

5. TORRES-LEAL, F.L., FONSECA-ALANIZ, M., Vianna, D., TEODORO, G. F. R., PIRES, I.S., CAPITANI, M., Pantaleão, L.C., Donato Jr., J., TIRAPEGUI, J.

Leucine associated with exercise reduces body weight and improves the lipid profile of obese rats In: ACSM 56th Annual Meeting Final Program, 2009, Seattle.

Medicine & Science in Sports & Exercise. , 2009. v.41. p.S423 - S423

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

6. Vianna, D., Donato Jr., J., TEODORO, G. F. R., TORRES-LEAL, F.L., TIRAPEGUI, J.

Leucine supplementation attenuates body-fat gain during aging in rats In: 19th International Congress of Nutrition, 2009, Bangkok.

Annals of Nutrition and Metabolism. , 2009. v.55. p.498 - 499

Referências adicionais : Tailândia/Inglês. Meio de divulgação: Vários, Home page: [http://www.karger.com/anm]

7. TEODORO, G. F. R., Vianna, D., OUGUSIKO, D. C. S., CARRERA, C. M.

Análise da Composição corporal de pacientes portadores do HIV/AIDS em uso de terapia Anti-Retroviral In: XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006, São Paulo.

Análise da Composição corporal de pacientes portadores do HIV/AIDS em uso de terapia Anti-Retroviral.. , 2006.

Áreas do conhecimento : Nutrição

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

8. TEODORO, G. F. R., CARVALHO, F.O., ALMEIDA-JUNIOR, A.A., YUGE, M.H.S., GOBBO, L.A., CYRINO, E.S.

Análise do comportamento d gordura corporal relativa e da distribuição da gordura corporal em mulheres sedentárias In: I Congresso Brasileiro de Metabolismo Nutrição e Exercício, 2006, Londrina.

I Congresso Brasileiro de Metabolismo Nutrição e Exercício. , 2006.

Áreas do conhecimento : Nutrição Esporte

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

9. TEODORO, G. F. R., Vianna, D.

Aspectos Tecnológicos do iogurte sabor morango obtido a partir do extrato hidrosolúvel de soja In: XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006, São Paulo.

Aspectos Tecnológicos do iogurte sabor morango obtido a partir do extrato hidrosolúvel de soja. , 2006.

Áreas do conhecimento : Nutrição

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

10. CUCATO, G. G., ALMEIDA-JUNIOR, A.A., CARVALHO, F.O., YUGE, M.H.S., TEODORO, G. F. R., RONQUE, E. R.V., CYRINO, E.S.

Comparação da composição corporal entre meninos e meninas adolscentes sedentários. In: I Congresso Brasileiro de Metabolismo Nutrição e Exercício, 2006, Londrina.

I Congresso Brasileiro de Metabolismo Nutrição e Exercício. , 2006.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

11. CUNHA, S.C., TEODORO, G. F. R., CARVALHO, F.O., ALMEIDA-JUNIOR, A.A., YUGE, M.H.S., GUILHERME, V.S., SERASSUELO-JUNIOR, H., CYRINO, E.S.

Comportamento de indicadores da composição corporal e da distribuição da gordura em homens e mulheres sedentários de 18 a 30 anos In: I Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício, 2006, Londrina.

I Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício. , 2006.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Apresentação de Trabalho

1. TEODORO, G. F. R., Donato Jr., J., Vianna, D., TORRES-LEAL, F.L., PIRES, I.S., TIRAPEGUI, J.

Efeitos da suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada sobre a composição corporal em proles de fêmeas submetidas a desnutrição protéica materna, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Chile/Português. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Santiago; Evento: XV Congreso Latinoamericano de Nutrición, XVI Jornadas de la Sociedad Chilena de Nutrición; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Latinoamericana de Alimentação e Nutrição (SLAN)

2. TEODORO, G. F. R., TORRES-LEAL, F.L., FONSECA-ALANIZ, M., Vianna, D., PIRES, I.S., CAPITANI, M., Pantaleão, L.C., Donato Jr., J., Rogero, M.M., Lima, F.B., TIRAPEGUI, J.

Effect of leucine and exercise on fat and metabolism of glucose in previously obese rats, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Estados Unidos; Cidade: Seattle; Evento: ACSM 56th Annual Meeting Final Program; Inst.promotora/financiadora: American College of sports medicine

3. TEODORO, G. F. R., Donato Jr., J., Vianna, D., TORRES-LEAL, F.L., TIRAPEGUI, J.

Effects of BCAA supplementation on offsprings submitted to maternal protein restriction, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Tailândia/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Bangkok; Evento: 19th International

4. TORRES-LEAL, F.L., FONSECA-ALANIZ, M., Vianna, D., TEODORO, G. F. R., TIRAPEGUI, J.

Insulin resistent rats make higher deposition of fat with leucine supplementation after exercise., 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Tailândia/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Bangkok; Evento: 19th International Congress of Nutrition

5. TORRES-LEAL, F.L., FONSECA-ALANIZ, M., Vianna, D., TEODORO, G. F. R., PIRES, I.S., CAPITANI, M., Pantaleão, L.C., Donato Jr., J., TIRAPEGUI, J.

Leucine associated with exercise reduces body weight and improves the lipid profile of obese rats, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Estados Unidos; Cidade: Seattle; Evento: ACSM 56th Annual Meeting Final Program; Inst.promotora/financiadora: American College of sports medicine

6. Vianna, D., Donato Jr., J., TEODORO, G. F. R., TORRES-LEAL, F.L., TIRAPEGUI, J.

Leucine supplementation attenuates body-fat gain during aging in rats, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Tailândia/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Bangkok; Evento: 19th International Congress of Nutrition

7. TORRES-LEAL, F.L., FONSECA-ALANIZ, M., Vianna, D., TEODORO, G. F. R., PIRES, I.S., CAPITANI, M., TIRAPEGUI, J.

O efeito da expansividade do tecido adiposo sobre a manutenção da homeostase metabólica em ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica., 2008. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Nutrição

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Cidade: São Paulo; Evento: XXIII Seminário de Pós-Graduação e XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Universidade de São Paulo

8. TEODORO, G. F. R., OUGUSIKO, D. C. S., CARRERA, C. M., Vianna, D.

Análise da Composição corporal de pacientes portadores do HIV/AIDS em uso de terapia Anti-Retroviral, 2006. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Cidade: São Paulo; Evento: XIX Congresso Brasileiro de Nutrição; Inst.promotora/financiadora: ASBRAN e APAN

9. TEODORO, G. F. R., CARVALHO,F.O., ALMEIDA-JUNIOR, A.A., YUGE,M.H.S., GOBBO, L.A., CYRINO, E.S.

Análise do comportamento d gordura corporal relativa e da distribuição da gordura corporal em mulheres sedentárias, 2006. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Universidade Estadual de Londrina; Cidade: Londrina (PR); Evento: I Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício; Inst.promotora/financiadora: Universidade Estadual de Londrina

10. TEODORO, G. F. R., Vianna, D.

Aspectos Tecnológicos do iogurte sabor morango obtido a partir do extrato hidrosolúvel de soja, 2006. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: São Paulo; Evento: XIX Congresso Brasileiro de Nutrição; Inst.promotora/financiadora: ASBRAN e APAN

11. CUCATO, G. G., ALMEIDA-JUNIOR, A.A., CARVALHO,F.O., YUGE,M.H.S., TEODORO, G. F. R., RONQUE, E. R.V., CYRINO, E.S.

Comparação da composição corporal entre meninos e meninas adolscentes sedentários., 2006. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Universidade Estadual de Londrina; Cidade: Londrina (PR); Evento: I Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício; Inst.promotora/financiadora: Universidade Estadual de Londrina

12. CUNHA, S.C., TEODORO, G. F. R., CARVALHO, F.O., ALMEIDA-JUNIOR, A.A., YUGE, M.H.S., GUILHERME, V.S., SERASSUELO-JUNIOR, H., CYRINO, E.S.

Comportamento de indicadores da composição corporal e da distribuição da gordura em homens e mulheres sedentários de 18 a 30 anos, 2006. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Universidade Estadual de Londrina; Cidade: Londrina (PR); Evento: I Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício; Inst.promotora/financiadora: Universidade Estadual de Londrina

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. TEODORO, G. F. R.

Alimentação Saudável na Adolescência, 2005. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Áreas do conhecimento : Nutrição

Referências adicionais : Brasil/Português. 5 horas. Meio de divulgação: Outro

Palestra ministrada para os alunos sétimas séries do ensino fundamental deste estabelecimento de ensino.

Eventos

Participação em eventos

1. **Simpósio Anual de Nutrição Clínica, Saúde e Qualidade de Vida. "Nutrição nos ciclos da vida". Prevenção e Tratamento dos Fatores de Risco para Doença Cardiovascular.**, 2009. (Simpósio)

.

2. **V Simpósio Ácidos Graxos e Saúde**, 2009. (Simpósio)

.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIII Seminário de Pós-Graduação e XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2008. (Seminário)

O efeito da expansividade do tecido adiposo sobre a manutenção da homeostase metabólica em ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica.

4. **III Simposio Sinalização Celular**, 2008. (Simpósio)

.

5. **Simpósio Anual de Nutrição Clínica, Saúde e Qualidade de Vida. Mulher:Diferenciando a Alimentação da Nutrição.**, 2008. (Simpósio)

.

6. **Nutrição esportiva**, 2008. (Simpósio)

.

7. **IV Simpósio Ácidos Graxos e Saúde**, 2008. (Seminário)

.

8. **V congresso Paulista de Nutrição Clínica**, 2007. (Congresso)

.

9. **IV Congresso Paulista de Nutrição humana**, 2007. (Congresso)

.

10. **I Simpósio de Pesquisa e Ensino em Nutrigenômica**, 2007. (Simpósio)

.

11. **II Encontro Nacional sobre Saudabilidade Alimentar**, 2007. (Encontro)

.

12. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XIX Congresso Brasileiro de Nutrição**, 2006. (Congresso)
Análise da Composição corporal de pacientes portadores do HIV/AIDS em uso de terapia Anti-Retroviral.
13. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **I Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício**, 2006. (Congresso)
Análise do comportamento da gordura corporal relativa e da distribuição da gordura corporal em mulheres sedentárias.
14. Apresentação Oral no(a) **Ação Dia Das Mães**, 2006. (Outra)
Saúde em Foco.
15. Apresentação Oral no(a) **RUA DA SAÚDE - SINAMED E VOCÊ JUNTOS POR UMA VIDA MAIS SAUDÁVEL**, 2005. (Outra)
Evento: Rua da Saúde - Sinamed e Você Juntos Por Uma Vida Mais Saudável.
16. **Cirurgia Bariátrica - Avanços e Controvérsias**, 2005. (Simpósio)
.
17. **Avanços Tecnológicos em Nutrição Parenteral**, 2005. (Simpósio)
.
18. **Nutrição e Gastroenterologia: Uma relação de dupla mão**, 2005. (Simpósio)
.
19. **Congresso Brasileiro de Nutrição Integrada**, 2005. (Congresso)
.
20. **III Curso de atualização em nutrição clínica nas alterações mais comuns do sistema digestório**, 2005. (Outra)
.
21. **VII Fórum Paulista de Pesquisa em Nutrição Clínica e Experimental**, 2005. (Outra)
.
22. **JOPEF Nutrição: Alimentos Funcionais: uso e realidades da prática clínica**, 2005. (Outra)
.
23. **JOPEF Nutrição: Aspectos Nutricionais da Síndrome Metabólica**, 2005. (Outra)
.
24. **I Encontro Multiprofissional de atenção à saúde**, 2005. (Encontro)
.
25. **Interpretação de exames laboratoriais para diagnóstico nutricional**, 2004. (Oficina)
.
26. **JOPEF Nutrição: Nutrição & Mulher**, 2004. (Outra)
.
27. **IV Jornada de Nutrição**, 2004. (Outra)
.
28. **Gastronomia aplicada a nutrição**, 2004. (Oficina)
.
29. **XVIII Congresso Brasileiro de Nutrição**, 2004. (Congresso)

.

30. **JOPEF Nutrição: Nutrição Clínica e Funcional**, 2004. (Outra)

.

31. **Congresso Sul Brasileiro de Nutrição: Uma visão holística da saúde**, 2003. (Congresso)

.

32. **VII Congresso de Nutrologia**, 2002. (Congresso)

.

33. **II Jornada de Nutrição**, 2002. (Outra)

.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicado em periódico.....	2
Artigos aceitos para publicação.....	2
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	11
Apresentações de Trabalhos (Congresso).....	11
Apresentações de Trabalhos (Seminário).....	1

Produção Técnica

Curso de curta duração ministrado (outro).....	1
--	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	8
Participações em eventos (seminário).....	2
Participações em eventos (simpósio).....	9
Participações em eventos (oficina).....	2
Participações em eventos (encontro).....	2
Participações em eventos (outra).....	10

ANEXO 5. Artigos aprovados em Revistas Científicas (aceitos e no prelo)**Programação fetal: alterações no ambiente intra-uterino e consequências em longo prazo**

Gabriela Fullin Resende Teodoro, Daiana Vianna, Francisco Leonardo Torres-Leal, Julio Tirapegui

Resumo

A epidemia global da obesidade e patologias associadas tem representado um impacto substancial sobre a morbidade, mortalidade e qualidade de vida da população. Nesse sentido, a compreensão dos processos biológicos envolvidos nesta enfermidade e suas complicações, torna-se necessária para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e intervenção. Embora a genética e alguns fatores do estilo de vida sejam conhecidos por contribuir para o desenvolvimento desta doença, recentes estudos sugerem que o ambiente nutricional intra-uterino pode ter consequências importantes no sistema regulatório do metabolismo energético na vida adulta. Além disso, pesquisas têm sugerido que as principais doenças crônicas, incluindo doenças coronarianas, hipertensão, diabetes tipo 2 e obesidade, podem ser consequência de uma “programação”, na qual um estímulo ou insulto sofrido em períodos críticos do desenvolvimento fetal, afetaria permanentemente o metabolismo orgânico. Assim, a presente revisão visa abordar dados acerca da programação fetal e a origem fetal das doenças.

Palavras-chave: programação fetal, nutrição materna, peso ao nascer.

Revista Nutrição em Pauta, v. 17, p. 39-42, 2009.

Leucina: Novo Modulador no Processo de Síntese Protéica?

Daiana Vianna, Gabriela Fullin Resende Teodoro, Julio Tirapegui

Resumo

Os aminoácidos essenciais leucina, isoleucina e valina constituem os denominados aminoácidos de cadeia ramificada (ACR). Além de servirem como substratos para a síntese protéica, estes são capazes de estimular processos anabólicos. Nesse sentido, a leucina vem recebendo maior destaque por ativar uma cascata de eventos bioquímicos intracelulares que culminam na fosforilação de proteínas envolvidas na etapa de tradução protéica. Adicionalmente, a administração oral deste aminoácido acarreta um ligeiro e transitório aumento na concentração de insulina sérica, fato este que age de modo permissivo para estimulação da síntese protéica induzida pela leucina. Sendo assim, a presente revisão tem como objetivo abordar aspectos metabólicos relacionados à leucina e sua influência sobre a síntese protéica.

Palavras-chave: aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, síntese protéica, insulina

Revista Nutrição em Pauta, v. 16, p.12-15, 2008.

BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o trabalho: “**Regulação da síntese protéica pela leucina**” de autoria de Daiana Vianna, Gabriela Fullin Resende Teodoro, Francisco Leonardo Torres-Leal e Júlio Tirapegui, foi aceito para publicação no **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**.

São Paulo, 03 de agosto de 2009.

Leila Rangel de Carvalho Aranha
Editoria Executiva

Regulação da síntese protéica pela leucina

Daiana Vianna¹; Gabriela Fullin Resende Teodoro¹; Francisco Leonardo Torres-Leal², Julio Tirapegui^{1, 2*}

¹Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, ²Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Estudos in vivo e in vitro verificaram que dietas hiperprotéicas influenciam a síntese protéica e regulam vários processos celulares. O papel dos aminoácidos como substrato para a síntese de proteínas já está bem evidenciado na literatura, porém as formas como esses aminoácidos modulam a etapa da transcrição e regulam a tradução do RNAm, pela via de sinalização dependente da mTOR, ainda não estão totalmente esclarecidas. Tem sido verificado que a mTOR é uma proteína responsável por ativar uma cascata de eventos bioquímicos intracelulares que culminam na ativação do processo de tradução protéica. Dentre todos os aminoácidos, a leucina é a mais eficaz em estimular a síntese protéica, reduzir a proteólise e, portanto, favorecer o balanço nitrogenado positivo, possivelmente por favorecer a ativação desta proteína. Além disso, este aminoácido estimula direta e indiretamente a síntese e a secreção de insulina, e assim aumenta as propriedades anabólicas celulares. Nesse sentido, a presente revisão tem como objetivo identificar o papel da leucina na modulação da síntese protéica e abordar aspectos metabólicos relacionados a este aminoácido.

Unitermos: Leucina. Proteínas/síntese. Fatores de Transcrição. mTOR. Tradução Protéica.

Nutrire

Prezado Prof. Julio Tirapegui,

Informamos com grande satisfação que o artigo de sua autoria (anexo):

"ASPECTOS ATUAIS DO EFEITO DA LEUCINA SOBRE O CONTROLE GLICÊMICO E A RESISTÊNCIA À INSULINA"

Está aprovado para publicação na revista Nutrire, vol. 35 – n. 2 – ago/2010, após as modificações sugeridas de acordo com o parecer que anexamos.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Célia Colli

Editora Científica

REVISTA NUTRIRE – Protocolo: CN462

Título: Aspectos atuais do efeito da leucina sobre o controle glicêmico e a resistência à insulina

Francisco Leonardo Torres-Leal, Daiana Vianna, Gabriela Fullin Resende Teodoro, Mariana Dutilh de Capitani, Julio Tirapegui

Resumo

A incidência da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2 está aumentando em proporções epidêmicas. Atualmente, diversos estudos têm sugerido que sinais oriundos de aminoácidos e hormônios apresentam convergência, podendo favorecer mudanças no metabolismo da glicose e na sensibilidade à insulina e, portanto, exercem efeitos sobre a manutenção do peso corporal. Embora estudos *in vitro* e *in vivo* apresentem importantes efeitos da leucina na homeostase energética, por possíveis efeitos na saciedade e no aumento do gasto energético, bem como nos genes e na expressão de proteínas em vários tecidos principalmente nos adiposos, outros efeitos têm sido destacados por prejudicar a homeostase da glicose, promovendo a resistência à insulina e o aumento da gliconeogênese. Além disso, a sinalização da leucina é integrada pela proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), um sensor energético, que fosforila a proteína S6k, sendo esta capaz de agir por *feedback* negativo, fosforilando na serina 307 o substrato do receptor de insulina-1 e, conseqüentemente, favorecendo a resistência à insulina. Desse modo, o entendimento integrado dos sinais transducionais, hormonais e por nutrientes

(leucina), podem favorecer o esclarecimento sobre novas abordagens para o tratamento de várias doenças metabólicas, tais como a obesidade e o diabetes. Posto isso, o objetivo deste estudo foi revisar o papel da leucina no controle glicêmico e na resistência à insulina.

Palavras-chave: Adipócitos; Leucina; Glicemia; Resistência à Insulina