

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e UEPG)**

CLÁUDIA REGINA CAPRIGLIONI CANCIAN

**A MANIPULAÇÃO DA PROLE DURANTE O PERÍODO LACTACIONAL MODIFICA
A MORFOFISIOLOGIA MATERNA.**

**PONTA GROSSA
2014**

CLÁUDIA REGINA CAPRIGLIONI CANCIAN

**A MANIPULAÇÃO DA PROLE DURANTE O PERÍODO LACTACIONAL MODIFICA
A MORFOFISIOLOGIA MATERNA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Prof^a Dr^a Sabrina Grassioli

PONTA GROSSA

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

C215 Cancian, Cláudia Regina Capriglioni
A Manipulação da prole durante o
período lactacional modifica a
morfofisiologia materna/ Cláudia Regina
Capriglioni Cancian. Ponta Grossa, 2014.
108f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Biológicas - Área de Concentração:
Biologia Evolutiva), Universidade Estadual
de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sabrina
Grassioli.

1.Programação metabólica. 2.Mães.
3.Obesidade. 4.Lactação. I.Grassioli,
Sabrina. II. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Mestrado em Ciências
Biológicas. III. T.

CDD: 616.39

Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta
Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e
Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste
(Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 06/2014

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **CLÁUDIA REGINA CAPRIGLIONI CANSIAN**.

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e quatorze, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência da Dr^a Sabrina Grassioli em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **CLÁUDIA REGINA CAPRIGLIONI CANSIAN**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Sabrina Grassioli (Orientadora UEPG), Dr. Julio Cezar de Oliveira (UEM) e Dr^a Viviane Nogaroto Vicari (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**A Manipulação da Prole Durante o Período Lactacional Modifica a Morfofisiologia Materna**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de trinta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 60 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de dois mil e quatorze.

Prof^a Dr^a Sabrina Grassioli

Prof Dr. Julio Cezar de Oliveira

Prof^a Dr^a Viviane Nogaroto Vicari

DEDICATÓRIA

Dedico a minha família, com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

Desde meus primeiros passos...

À Prof^a Dr^a Maria Albertina de Miranda Soares. Pessoa e profissional valorosa, quem acreditou em mim, ao mesmo tempo em que me recebeu de braços abertos ao me mostrar o caminho pelo qual eu deveria trilhar. Mais do que isso, que se mostrou responsável por mim, que ficou próxima em todos os momentos, até naqueles em que me senti no abandono. Para você, minha enorme gratidão.

Ao Professor Dr. Jose Rosa Gomes que confiou a mim os segredos da Histologia, por onde pude caminhar com confiança. Conduziu-me até as mãos da querida Maria Inês Cordeiro quando juntos me ajudaram a refazer o caminho acadêmico. Obrigada!

Prof^a Dr^a Cristina Lúcia Sant'Ana Costa Ayub e Prof^a Dr^a Viviane Nogaroto Vicari, minha enorme gratidão pela valiosa contribuição científica. Mas, agradeço, acima de tudo, pelo exemplo de respeito aos valores humanos acima de tudo. Muito Obrigada!

Agradeço a presença alegre dos alunos de iniciação científica e TCC, principalmente por dividirem o fardo pesado desta pesquisa com modelo animal. Realmente, essa tarefa somente foi possível com a ajuda de todos vocês.

Agradeço às colegas Nayara de Carvalho Leite, Elisangela Gueiber Montes e em especial à Stefani Valéria Fischer pela ajuda e o tempo dedicado, porque na vida tudo passa, mas desejo que desta fase tão trabalhosa de nossas vidas, reste sempre a lembrança do respeito, da gratidão e da cumplicidade. Obrigada!

Agradeço à Prof^a Dr^a Sabrina Grassioli, minha orientadora por me aceitar como sua aluna, mesmo sem me conhecer. Agradeço por me guiar nestes dois anos, por me permitir vivenciar este universo de aulas e experimentos animais, por me dar a oportunidade de viver a realidade de um Curso de Mestrado, por todo o seu empenho e por acreditar que eu sou capaz. Muito Obrigada!

Agradeço às colegas do Biotério, Maria e Mari, que com todo carinho nos ensinaram a conviver diariamente com os animais, inclusive nos finais de semana. Muito obrigada.

Aos professores e alunos do curso de Odontologia que nos acolheram com carinho e respeito durante todo o período que duraram as sessões de fotografias da Histologia.

A todos que fazem parte da minha vida e que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Às minhas amigas do Banco de Leite Humano, que souberam me dar força e apoio para continuar e concluir esta etapa da minha vida, apesar dos dois anos de sistemáticas ausências no local de trabalho. Vocês são exemplos de dedicação, respeito ao trabalho e ao ser humano. Muito obrigada!

Agradeço ao meu irmão, a todos da família, aos parentes, aos afilhados e as amigas pelo tempo roubado do nosso convívio para que eu pudesse realizar meu sonho de retornar a estudar. Agora sigo segura, pois fiz o que mais queria e procurei fazer o meu melhor! Obrigada por me ajudarem, por torcerem por mim, não cobrarem nada em troca e ainda assim nada abalar nossos laços.

Agradeço separadamente à Eucélia de Oliveira Fontes, que sem limites para servir, com dedicação, amor e responsabilidade como nunca vi igual, tornou possível eu me ausentar de casa, sem deixar danos irreparáveis. Você é sensacional! Muito obrigada, seu carinho foi e é dádiva de Deus em minha vida!

Agradeço aos meus pais Luzimar Busnello Capriglioni e Lívia Dias Coelho que sempre fizeram o melhor por mim, estiveram sempre presentes, me deram os maiores exemplos de força e superação, além do imenso amor e apoio. Amo muito vocês!

Minha família de mais perto, Pércles, Mariana e Rodrigo que são meu maior tesouro, eu quero agradecer a vocês, por tornarem meus dias mais bonitos, ricos e alegres, além de darem à minha vida mais sentido sempre! Quero dizer que estou de volta para viver nosso amor!!! É por vocês que vale a vida! Amo muito vocês, também!

Por fim, o mais importante! Quero agradecer a Deus por todos os passos dados, em cada dia vivido; por toda proteção e benção recebida, pois sei que cada agradecimento acima é sinal do amor de Deus na minha vida.

“A minha carne e meu coração desfalecem, mas Deus é a fortaleza do meu coração.” Salmo 73:26

“Tudo aquilo que o Homem ignora, não existe para ele. Por isso, o Universo de cada um, se resume ao tamanho de seu saber.” Albert Einstein.

“Aos outros eu dou o direito de ser como são, a mim, dou o dever de ser cada dia melhor” Chico Xavier.

RESUMO

O acúmulo excessivo de tecido adiposo associado à estados patológicos, caracteriza a obesidade e sobrepeso. Estudos recentes apontam que a obesidade pode ser oriunda das alterações hormonais e/ou neurais ocorridas em períodos críticos do desenvolvimento. A lactação é considerada uma importante janela do desenvolvimento, alterações nesta fase podem programar o metabolismo do filhote e determinar a instalação de obesidade na vida adulta. Dentro deste contexto, poucos estudos exploram os ajustes maternos frente a modificações da prole. **Objetivo:** Deste modo, o objetivo do presente estudo foi investigar as adaptações morfofisiológicas maternas promovidas pela obesidade da prole induzida no período lactacional. **Metodologia:** Progenitoras de dois modelos de obesidade obtidos durante a lactação foram estudadas. No modelo de hipernutrição lactacional o número de filhotes da prole foi manipulado no 3º dia após o nascimento, formando Ninhada-Reduzida (NR, 3 filhotes) e Ninhada-Normal (NN, 9 filhotes). No modelo de obesidade hipotalâmica, os filhotes receberam no 2º dia após o nascimento glutamato monossódico (MSG, 4g/Kg) ou salina (CON, controles) durante 5 dias consecutivos. Assim, 4 grupos de mães foram avaliadas: Mães-NR *versus* Mães-NN; Mães-MSG *versus* Mães-CON. Para todos os grupos foi acompanhado o peso corporal e a ingesta alimentar durante a lactação. O peso das ninhadas também foi avaliado neste período. No 21º de lactação, as ratas foram anestesiadas e receberam uma dose de ocitocina (5U/l) para estimular ejeção do leite. Posteriormente, o leite foi coletado e alíquotas usadas para análises da composição pelo crematócrito e dosagens das proteínas. Em seguida, as ratas foram sacrificadas, o sangue coletado para análises bioquímicas e os depósitos de gordura retirados e pesados. Amostras do tecido mamário, tecido adiposo branco (TAB), tecido adiposo marrom (TAM) e do pâncreas foram submetidas a procedimentos histológicos, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas sob microscópio de luz. O teor de leucócitos do leite também foi avaliado por técnica histológica. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão médio (epm) e avaliados pelo teste t de Student ($p < 0,05$). **Resultados e Discussão:** Mães-NR apresentaram redução de aproximadamente 36% no consumo de ração e água. Redução de 10% na ingesta alimentar, sem alterar o consumo de água também foi observado nas Mães-MSG. Em ambos, o peso corporal não foi afetado. Todavia, Mães-NR e Mães-MSG apresentaram aumentos de aproximadamente 56% e 40%, respectivamente no teor de gordura ovariana. Estas alterações foram acompanhadas de hipertrofia dos adipócitos da gordura retroperitoneal, (Mães-NR 67%, Mães-MSG 22%). As Mães-NR apresentaram hipertrofia (30%) na gordura ovariana e também apresentaram aumento de 28% no número de adipócitos do TAM. Análises bioquímicas do plasma demonstraram que em ambos os grupos ocorreu aumento de glicose (Mães-NR 33%, Mães-MSG 35%), triglicerídeos (Mães-NR 43%, Mães-MSG 73%) e insulina (Mães-NR 46%, Mães-MSG 69%), comparados aos respectivos grupos controles. Todavia, apenas nas Mães-NR estas alterações foram acompanhadas de aumento das calorias do leite (32%) e do teor de gorduras (44%). O leite de Mães-MSG apresentou apenas aumento na quantidade de leucócitos (54%). A glândula mamária de ambos os grupos apresentou aumento no teor de adipócitos (Mães-NR 1215%, Mães-MSG 41%). Alterações morfológicas também foram observadas no pâncreas endócrino de ambos os grupos. Ilhotas pancreáticas de Mães-MSG apresentaram hipertrofia (70%), enquanto ilhotas pancreáticas de Mães-NR apresentaram hipotrofia (24%), em relação aos grupos controles. Os ajustes morfofisiológicos observados em nossos dados provavelmente estão relacionados a menor demanda energética, promovida pela redução do número de filhotes da prole, no caso de Mães-NR e por alterações na sucção provocadas nos filhotes MSG pela lesão hipotalâmica induzida pelo MSG. **Conclusão:** A análise dos dados demonstra que as manipulações da prole, promoveram as seguintes adaptações maternas: i) Elevação do teor de gordura corporal e alteração do perfil lipídico e de carboidratos do plasma materno. ii) Modificação da composição do leite, aumentando o teor calórico. Estas mudanças são acompanhadas das alterações na morfologia da glândula mamária. iii) alteração da histomorfologia do pâncreas endócrino, elevando os níveis circulantes de insulina.

Palavras chave: Programação metabólica, mães, obesidade, lactação.

ABSTRACT

The excess of adipose tissue associated to pathological states, characterizes obesity and overweight. Recent studies have pointed out that the obesity might originate from hormonal and/or neural changes occurred in critical periods of development. Lactation is considered an important developmental window; nutritional changes in this phase might program the offspring metabolism to determine the installation of obesity in adult life. Within this context, few studies have explored the mother adjustments to the offspring changes. **Objective:** The objective of this present study was to investigate the mother's morpho-physiological adaptations promoted by the offspring obesity induced in the lactation period. **Methodology:** Mothers of two kinds of obesity obtained during lactation were studied. In the hyper-nutrition model of lactation the number of offsprings was manipulated 3 days after birth forming a reduced-litter (NR, 3 offsprings) and normal-litter (NN, 9 offsprings). In the hypothalamic obesity model the offsprings received monosodium glutamate (MSG, 4g/Kg) or saline (CON, control) from the 2nd day after birth for five consecutive days. Thus, 4 groups of mothers were evaluated: Mothers-NR x Mothers-NN; Mothers-MSG x Mothers-CON. All groups had body weight and food intake monitored throughout the lactation period. The litter weight was also evaluated during this period. On the 21st day of lactation, after weaning, the rats were anesthetized and received a dose of oxytocin (5U/l) to stimulate milk ejection. Then the milk was collected and aliquots used for the analysis of composition by the creatocrit and proteins. Next, the rats were sacrificed and the blood collected for biochemical analysis and the fat deposits were extracted and weighed. Mammal tissue samples, white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT) and pancreas were all submitted to histological procedures, dyed with H&E and analyzed through microscopy. The milk leukocytes content was also evaluated through the histological technique. Data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (sem) and evaluated through the Student t test ($p < 0,05$). **Results and Discussion:** Mothers-NR presented about 36% reduction in the consumption of food and water. 10% reduction in food intake, without changes in water consumption was observed with the Mothers-MSG. There was no alteration of body weight. However, Mothers-NR and Mothers-MSG presented increase of about 56% and 40%, respectively, in ovary fat content. These changes were followed by retroperitoneal fat adipose hypertrophy, (Mothers-NR 67%, Mothers-MSG 22%). The Mothers-NR presented ovary fat hypertrophy (30%), also presented 28% increase in the number of BAT adipose. Biochemical measurements of plasma revealed that both groups presented increase in glucose (Mothers-NR 33%, Mothers-MSG 35%) triglycerides (Mothers-NR 43%, Mothers-MSG 73%) and insulin (Mothers-NR 46%, Mothers-MSG 69%) when compared to the control groups. However, only the Mothers-NR presented changes followed by increase in the milk calories (32%) and fat content (44%). The Mothers-MSG's milk presented only increase in the amount of leukocytes (54%). The mammal gland in both groups presented increase in adipose content (Mothers-NR 1215%, Mothers-MSG 41%). Morphological changes were also observed in the endocrine pancreas of both groups. Mothers-MSG's pancreatic islets presented hypertrophy (69%), while the Mothers-NR's pancreatic islets presented hypotrophy (24%) in relation to the control groups. Morpho-physiological adjustments observed in this data are probably related to the lower energy demand, promoted by the reduction in the number of offsprings, in the case of Mothers-NR and due to changes of suction provoked in the MSG offsprings by the hypothalamic lesion induced by MSG. **Conclusion:** Data analysis shows that the offspring manipulation promoted the following mother adaptations: i) increase in body fat content and changes in the lipid profile and mother plasma carbohydrates. ii) changes in the milk composition, with increase in the caloric content. These changes were followed by alteration of the mammal gland morphology. iii) changes in the endocrine pancreas histo-morphology, increasing insulin circulating levels.

Key words: Metabolic programming, mothers, obesity, lactation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático representativo de quatro fases do desenvolvimento da glândula mamária de rato. _____	24
Figura 2 – Fotografias de histologia de glândula mamária de rata corada em H&E. _____	25
Figura 3 – Representação esquemática da ampliação do ARQ e sua localização no encéfalo. _____	34
Figura 4 – Representação da secreção de insulina pela célula β . _____	38
Figura 5 – Vias da fosforilação e transcrição da insulina _____	41
Figura 6 – Micrografia eletrônica de tecido adiposo _____	43
Figura 7 – Adipocinas _____	48
Figura 8 – Representação esquemática do fluxograma da composição dos grupos _____	60
Figura 9 – Efeito da manipulação da prole sobre o consumo de ração, de água e peso das mães durante a lactação. _____	68
Figura 10 - Efeito da manipulação da prole durante o período lactacional sobre a histomorfologia das glândulas mamárias. ____	70
Figura 11 - Efeitos da manipulação da prole no conteúdo e morfologia da Gordura Periovariana das Mães. _____	72
Figura 12 - A morfologia da gordura retroperitoneal das mães, sob o efeito da manipulação na prole. _____	74
Figura 13 - Avaliação da manipulação da prole durante a lactação sobre o tecido adiposo marrom interescapular em Mães. _____	75
Figura 14 - Efeito da manipulação da prole na morfologia do pâncreas das mães. _____	77
Figura 15 - Peso da gordura retroperitoneal da prole. _____	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes do leite em roedores e humanos. _____28

Tabela 2 – Protocolo de histologia para inclusão em parafina. _____65

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos do plasma das mães aos 21 dias de lactação_69

Tabela 4 – Composição do leite das mães no 21º dia de lactação. _____69

LISTA DE ABREVIATURAS

ACH	Acetilcolina
AGL	Ácido Graxo Livre
AgRP	Proteína agouti relacionada
Akt	Proteína quinase B
ARQ	Núcleo Arqueado
ASC	Área sob a curva
ATP/ADP	Adenosina- trifosfato/ Adenosina- Difosfato
Ca⁺²	Cálcio
CART	Transcrito relacionado à Anfetamina e Cocaína
CCK	Colecistoquinina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CON	Controle
DCV	Doença cardiovascular
DG	Diabetes gestacional
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>
epm	Erro padrão médio
GH	Hormônio do crescimento
GLP1	Peptídeo similar ao Glucagon 1
GLUT	Transportador de glicose sub tipo 1, 2, 3 ou 4
GM	Glândula Mamária
H&E	Hematoxilina e Eosina
HA	Hipotálamo Anterior
HDM	Hipotálamo Dorsomedial
HL	Hipotálamo Lateral
HVM	Hipotálamo Ventromedial
IKK	I kappa quinase
IL-6	Interleucina 6
IR	Receptor de Insulina
IRS1	Substrato do receptor de insulina 1
IRS2	Substrato do receptor de insulina 2
JNK	c-jun aminoterminal quinase
K⁺	Potássio

K_{ATP}	Canais de potássio sensíveis ao ATP
LPL	Lipase de lipoproteína
MAPK	Proteinoquinase ativada por mitógeno
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
MSG	Glutamato monossódico
NN	Ninhada Normal
NSO	Núcleo Supraóptico
NPV	Núcleo Paraventricular
NPY	Neuro peptídeo Y
NR	Ninhada Reduzida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI-1	Inibidor do Fator Ativador do plasminogênio 1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC	Proteinoquinase C
POMC	Pro-opiomelanocortina
PP	Peptídeo pancreático
PRL	Prolactina
RI	Resistência à insulina
rpm	Rotações por minuto
SE	Sistema Endócrino
SM	Síndrome Metabólica
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	Sistema Nervoso Simpático
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TA	Tecido Adiposo
TAB	Tecido Adiposo branco
TAM	Tecido Adiposo marrom
TCC	Tamanho crítico da célula
TG	Triacilglicerol
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UCP1 2 ou 3	Proteína desacopladora 1,2 ou 3
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
α-MSH	Hormônio Estimulante do Melanócito α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 PROGRAMAÇÃO METABÓLICA	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 GLÂNDULA MAMÁRIA (GM)	20
2.1.1 Evolução da GM	21
2.1.2 Morfologia da GM - Regulação do Crescimento	23
2.1.3 Composição do Leite	27
2.2 HOMEOSTASE	30
2.3 SISTEMA NERVOSO CENTRAL - Homeostase Energética	31
2.4 METABOLISMO DA GLICOSE	35
2.5 SISTEMA ENDÓCRINO - O Pâncreas no controle glicêmico	37
2.5.1 Via de Ação da Insulina	40
2.6 TECIDO ADIPOSEO	42
2.6.1 Tecido Adiposo Branco – TAB	43
2.6.2 TAB e Adipocinas	45
2.6.3 Tecido Adiposo Marrom - TAM	49
2.7 SÍNDROME METABÓLICA	51
2.8 MODELOS DE OBESIDADE	53
2.8.1 Modelo de Programação Metabólica	54
2.8.2 Modelo Glutamato Monossódico (MSG)	56
3 OBJETIVOS	58
3.1 OBJETIVO GERAL	58
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 ANIMAIS	59
4.2 ORDENHA DO LEITE	61
4.3 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS NO LEITE	61
4.4 CREMATÓCRITO DO LEITE	62
4.5 DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS NO LEITE	63
4.6 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO	63
4.7 AVALIAÇÃO DA GORDURA	64
4.8 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS	64

4.9 HISTOLOGIA	64
4.10 PROLE	66
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5 RESULTADOS	67
5.1 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO	67
5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	68
5.3 COMPOSIÇÃO DO LEITE	69
5.4 HISTOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA – GM	70
5.5 HISTOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO - TAB	71
5.5.1 Gordura Periovariana	71
5.5.2 Gordura Retroperitoneal	73
5.6 HISTOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO MARROM - TAM	75
5.7 HISTOLOGIA DO PÂNCREAS	76
5.8 PROLE	78
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÃO	89
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
9 ANEXOS Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	105

1 INTRODUÇÃO

A principal atividade dos seres vivos, tanto no reino animal como vegetal é a aquisição de energia, processo que garante a sobrevivência. Na sociedade humana não é diferente, todavia neste caso, além do papel fisiológico, a alimentação inclui aspectos culturais e comportamentais (MINTZ, 2001). Atualmente, a competição por “status”, quem pode mais come mais e “melhor”, impera na nossa civilização ocidental, que é capitalista e consumista. Rodeados por alimentos hipercalóricos e seguindo a lei do menor esforço, chega-se ao desequilíbrio energético. Inger-se mais energia do que se precisa. Este é o principal caminho para a obesidade, delineada por múltiplos fatores, tais como, genéticos, epigenéticos, endócrinos, neurais, comportamentais e ambientais (TIBANA; PRESTES, 2013). Em conjunto, estes fatores ditam o perfil metabólico de um organismo, determinando o equilíbrio entre a energia ingerida e a consumida, evento fisiologicamente definido como “*homeostase energética*” (GUYTON; HALL; GUYTON, 2006; PINNEY; SIMMONS, 2010). O excesso de energia ingerida é convertido em formas estocáveis de reserva energética, como glicogênio e triglicerídeos. O tecido adiposo desempenha um papel primordial neste processo, uma vez que é capaz de armazenar grande quantidade de substratos energéticos na forma de gordura, contribuindo para o ganho de peso corpóreo (GUYTON; HALL; GUYTON, 2006; FRÜHBECK, 2008).

Sobrepeso e obesidade são definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “acúmulo anormal ou excessivo de tecido adiposo que apresenta risco para a saúde” (WHO, 2011). Ambos são considerados os principais fatores de risco para doenças crônicas como diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (DCV) (CUNHA, 2007; ESPOSITO et al., 2012; XIAO; YANG, 2012). Achados clínicos como resistência à insulina (RI) hiperinsulinemia, dislipidemia, hiperleptinemia, obesidade abdominal e hiperglicemia de jejum são sinais característicos da síndrome metabólica (SM), um conjunto de alterações originadas pelo excesso de tecido adiposo, os quais somados são agravantes para as doenças acima citadas (CORNIER et al., 2008; KITZINGER; KARLE, 2013).

Algumas pessoas possuem um risco aumentado para desenvolver obesidade e SM na idade adulta. Ravelli; Stein e Susser (1976) no estudo clássico de desnutrição materna, responsabilizam as alterações nutricionais, durante o período

gestacional, pelo ganho de peso e obesidade na idade adulta. Este processo tem sido amplamente estudado e foi definido como programação fetal ou metabólica, caracterizado por mudanças ocorridas em período crítico do desenvolvimento (gestação e/ou lactação), capazes de determinarem alterações metabólicas no indivíduo adulto (TZSCHENTKE; PLAGEMANN, 2006).

Na maioria dos mamíferos, o desenvolvimento de vários órgãos não está completo no nascimento, o período de amamentação é portanto, uma importante fase para a maturação de muitos sistemas fisiológicos, tanto em aspecto histológicos como funcionais (PLAGEMANN et al., 1992). Sánchez-Muniz et al (2012) em seus estudos concluíram que estímulos ambientais, nutricionais, de natureza física, química ou mental neste período podem influenciar a expressão genômica na prole, para melhor adaptação ao ambiente.

Quando em fases especiais do desenvolvimento, tal como a lactação, os estímulos são inadequados eles podem afetar permanentemente o controle do apetite, a dinâmica de crescimento e a homeostase energética na idade adulta. A exemplo, a hipernutrição durante o período perinatal tem sido associada com a suscetibilidade ao excesso de peso, obesidade e suas comorbidades na vida adulta (OOSTING et al., 2013). Em roedores, a hipernutrição precoce pode ser induzida por redução no tamanho da ninhada, como demonstrado pela primeira vez por Kennedy (1957). Estudos subsequentes de Plagemann et al (1992; 1999) na década de 1990, demonstraram em ratos, que a redução do tamanho da ninhada, logo após o nascimento, leva a aumentos significativos na ingestão alimentar da prole, devido à maior disponibilidade de leite materno no período crítico imediato pós-natal.

Em geral, os estudos sobre obesidade com modelo animal podem partir de interferências provocadas nos progenitores ou diretamente nos indivíduos a fim de gerar obesos. As interferências podem ser genéticas, nutricionais, físicas, químicas ou ambientais, podendo seguir por gerações (RIBEIRO, 2009). Considerando a grande importância das inter-relações hormonais e metabólicas entre mães e filhos, a grande maioria dos estudos tem explorado as consequências destes processos para a prole, porém não trazem dados a respeito das modificações morfofisiológicas ocorridas nas mães, frente às alterações pós-natais provocadas na prole.

Deste modo, o presente trabalho explora a importância das interações neuro-hormonais entre mãe e sua prole, considerando em particular as alterações morfológicas e fisiológicas maternas, resultantes da manipulação na prole, no

período de lactação. Assim, avalia-se a possibilidade das progenitoras reproduzirem sinais gerados pela manipulação da prole na inter-relação dos filhos com a mãe, no período do aleitamento, em analogia à sinalização intrauterina do período pré-natal. Para esta finalidade trabalha-se com as progenitoras de dois diferentes modelos de indução de obesidade, ambos ocorrendo por manipulação da prole no período lactacional. No primeiro modelo, o número de filhotes da prole é reduzido, promovendo hipernutrição lactacional, reproduzindo o modelo de marcação metabólica. No segundo modelo, os filhotes são submetidos à lesão hipotalâmica química, baseada na aplicação de sobrecarga de glutamato monossódico (MSG) também no período lactacional.

1.1 PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

A maioria das células no corpo humano contém o mesmo DNA, ainda que possuam uma imensa variedade de formatos, tamanhos e funções. Tais diferenças que surgem em modificações químicas no DNA e nas proteínas associadas ao DNA são chamadas de modificações epigenéticas que ajudam a guiar uma célula para exprimir apenas um subconjunto de genes, dando origem a características diferentes para cada tipo de célula. Algumas alterações epigenéticas promovem a saúde e o desenvolvimento normal, enquanto que outras podem contribuir para uma variedade de doenças. Epigenética foi definido por Holliday como "Herança Nuclear que não se baseia em diferenças na sequência de DNA" (HOLLIDAY, 2006).

A vida começa como um "saco de genes", mas é no início da vida (momento da concepção, durante a vida intrauterina e infância) que exposições ambientais e celulares ditarão como estes genes funcionarão. Uma pequena mudança nesse ambiente tem o potencial para alterar permanentemente a ação dos genes (YAJNIK; DESHMUKH, 2012). Esses processos, que regem a evolução do fenótipo de um indivíduo, a partir do genoma, da "epigenética", envolvem modificações químicas na estrutura da cromatina, que por metilação do DNA ou por acetilação das histonas, influenciam a expressão genética. Tais modificações químicas alteram o fenótipo apesar da herança de um mesmo genótipo (YAJNIK, 2010).

Segundo Waterland e Michels (2007), influências ambientais transitórias durante o desenvolvimento podem alterar permanentemente a regulação epigenética do gene resultando em programação metabólica que afeta a susceptibilidade do indivíduo à doença na vida adulta. Dentro deste contexto, estudos do *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD), uma especialidade emergente no conceito da programação/marcação metabólica, descreve o início da vida (no momento da concepção e/ou durante a vida fetal e primeira infância), como ambiente capaz de induzir mudanças no desenvolvimento que têm impacto de longo prazo sobre a saúde e risco de doença mais tarde na idade adulta (POWER; SCHULKIN, 2013).

Em dois exemplos de estudo com alimentação hiperlipídica em ratas, durante a gestação e lactação, foram observados que os pesos de nascimento dos filhotes eram semelhantes ao grupo controle, mas a partir do sexto dia os filhotes das mães de dietas hiperlipídica já apresentam diferença significativa no peso. Isso indica que

a produção diária de gordura, proteínas e lactose do leite foi alterada pela manipulação da gordura na dieta e conseqüentemente afetaram o crescimento da ninhada e geraram a programação (DEL PRADO; DELGADO; VILLALPANDO, 1997; NOGUEIRA NETO, 2008).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GLÂNDULA MAMÁRIA (GM)

A GM é um órgão exclusivo para a classe "Mammalia", com a função específica de sintetizar, secretar e entregar o leite para o recém-nascido na demanda por sua nutrição ideal, proteção e desenvolvimento (NEVILLE, 2001; BRAGULLA; KÖNIG, 2004). Sob o ponto de vista anatômo-microscópico, a GM é uma glândula sudorípara exócrina modificada, tubuloacínosa, composta por tipo secretório apócrino, isto é, o produto de secreção é descarregado junto com porções do citoplasma apical (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A GM, geralmente em número par, é constituída de tecido adiposo (TA), tecido glandular (parênquima) e o estroma ou tecido conjuntivo, ricamente vascularizado (BRAGULLA; KÖNIG, 2004).

GM é único órgão que trabalha continuamente, passa por mudanças plástica e cíclica durante a vida reprodutiva dos mamíferos do sexo feminino. Ela está localizada entre o tecido subcutâneo e o depósito de TA no dorso ventral. Durante a gravidez e lactação, o depósito adiposo subcutâneo do órgão passa por mudanças. O TA, progressivamente desaparece e um substancial desenvolvimento dos componentes da glândula epitelial secretoras de leite lóbulo-alveolar ocorre. Logo após o término da lactação, regridem os componentes glandulares e uma rápida e significativa adipogênese restaura a prevalência de tecido adiposo (MASSO-WELCH et al., 2000). Semelhante a outros depósitos adiposos, a GM é composta por adipócitos e a proporção relativa desses varia significativamente de acordo com a idade, espécie, temperatura do ambiente e do estado nutricional (SMORLESI et al., 2012).

Existem evidências de que durante a gravidez/lactação os adipócitos e as células epiteliais sofrem alterações em conjunto com a glândula, com declínio progressivo no número de adipócitos e consequente formação de glândulas epiteliais alveolares secretoras de leite (MCNAMARA, 1995). Este é um fenômeno plástico e reversível no final da lactação quando os componentes secretores de leite são substituídos por adipócitos restaurando a anatomia pré-gestacional. Segundo estas pesquisas todo o processo seria decorrente de propriedades biológicas

intrínsecas dos adipócitos, que são capazes de realizar transdiferenciação reversível (CINTI, 2009).

Segundo descrição de Smorlesi e colaboradores (2012), durante a gravidez, os adipócitos da GM parecem se transformar progressivamente em células epiteliais, formando a parte lóbulo-alveolar da GM responsável pela produção de leite. No fim da lactação, o componente lóbulo-alveolar desaparece e uma nova população de adipócitos restabelece a anatomia anterior à gravidez (SMORLESI et al., 2012). Tanto Smorlesi et al (2012), quanto Cinti (2009), são a favor da explicação de transformação direta de células epiteliais produtoras de leite em adipócitos e vice versa. Segundo Cinti (2009), os dados morfológicos sugerem uma sucessão de passos intermediários nos processos de “transdiferenciação” que converte os adipócitos em células do epitélio alveolar e ainda reverte este epitélio novamente em adipócitos durante a involução mamária.

Em busca de dados sobre o desenvolvimento da GM, para compreender melhor os processos de secreção do leite, os evolucionistas encontraram evidências de que na sequência do desenvolvimento da GM, a proteção foi a primeira função deste tecido e depois se instalou a função de nutrição da prole, como secundária (VORBACH; CAPECCHI; PENNINGER, 2006).

Sob a ótica da amamentação e da ligação desta com a obesidade, pesquisadores investigaram lactantes sob dieta com alto teor de gordura. Elas apresentaram tecido da GM com maior número de adipócitos e maiores, os lumens alveolares eram menores e os alvéolos de formas irregulares além de apresentarem a expressão de enzimas e receptores que regulam a involução da GM, significativamente aumentados. Os dados coletados indicam que sob dieta hiperlipídica ocorre a redução da atividade da glândula e de secreção do leite (HERNANDEZ et al., 2012).

Considerando a importância das alterações da GM para a produção láctea, neste estudo se incluiu a avaliação morfológica deste tecido.

2.1.1 Evolução da GM

Oftedal (2002) propôs que, na evolução dos monotremados em direção aos marsupiais, a GM foi derivada de uma glândula apócrina da pele que estava

associada aos folículos pilosos. A posição anatômica reforça a hipótese de a GM ter evoluído a partir do tecido glandular associado com folículos pilosos (MCCLELLAN; MILLER; HARTMANN, 2008). O precursor do leite pode ter sido secretado pela glândula hipertrofiada e tal secreção teve a seleção natural favorecida por impedir a dessecação do “ovo” e o ataque microbiano, visto que, em contraste com os ovos das aves, que possuem casca rígida, os ovos dos “monotremados” possuíam apenas uma película fina e porosa, sem casca e eram suscetíveis às intempéries (OFTEDAL, 2002).

Alguns pesquisadores buscam novas evidências apoiando a hipótese de que a função nutricional do leite evoluiu após a sua função protetora e sugerem que os componentes nutricionais evoluíram a partir de componentes do sistema imune inato, embora haja um forte argumento para sugerir que a GM evoluiu a partir da resposta inflamatória à infecção e danos no tecido (OFTEDAL, 2012; HERNANDEZ et al., 2012). Porém, imaginar que a proteção ampla que se desenvolveu no leite a fim de evitar ativamente uma inflamação, iniciou provocando inflamação parece ser uma contradição (MCCLELLAN; MILLER; HARTMANN, 2008). Na verdade, a maioria dos componentes nutricionais do leite que evoluíram, como proteínas, carboidratos e gorduras não são apenas exclusivos para leite, mas compartilham uma ascendência com os componentes do sistema inato imunitário. Portanto, é razoável supor que havia uma ligação estreita entre a nutrição evolutiva e sistema imune (MCCLELLAN; MILLER; HARTMANN, 2008).

O reflexo de ejeção do leite é altamente conservado em todas as espécies de mamíferos, a partir do “equidna” e “quokka” (mamíferos que põem ovos) até nas mulheres. A ocitocina é avaliada como um dos hormônios mais altamente conservados; os peptídeos de ocitocina existem em peixes, répteis, aves e mamíferos, nos quais diferem apenas por um ou dois aminoácidos. Assim, comportamentos maternos que são proteção e sustento, regulados pela ocitocina podem ter estado presentes antes da evolução da lactação. Subsequentemente, quando o aleitamento evoluiu, a ocitocina foi cooptada para ter um papel essencial na nutrição, facilitando a retirada do leite (VORBACH; CAPECCHI; PENNINGER, 2006).

Além disso, há evidências de que os compartimentos epiteliais e adiposos da GM sofrem rearranjos e deslocamentos regulados pelo metabolismo lipídico,

controlados por proteínas como perilipina e adipofilina, que são supostos reguladores de acúmulo de lipídios nas células eucarióticas. Portanto, os tecidos adiposo e epitelial da GM, são responsáveis pelo aumento relativo e pela disponibilidade de ácidos graxos quando necessários, para a síntese de lipídeos nas células secretoras do leite (RUSSELL et al., 2007). Por fim, a lactação é regulada por importantes hormônios, a leptina, a prolactina (PRL) e a insulina, que juntos coordenam desde a diferenciação celular até a regulação final da secreção láctea passando pela síntese de lipídeos e dos aminoácidos para todas as espécies de mamíferos (PICÓ et al., 2007; MOHAMMAD; HAYMOND, 2013; CARRÉ; BINART, 2013).

2.1.2 Morfologia da GM - Regulação do Crescimento

O parênquima alveolar é o conjunto de células epiteliais que sintetizam alguns componentes do leite e retiram outros do plasma, secretando-os no lúmen. Os alvéolos mamários drenam o leite para ductos pequenos que vão progressivamente se unindo a ductos maiores até abrir em uma cisterna ou diretamente no exterior do mamilo (BRAGULLA; KÖNIG, 2004). Os alvéolos são agrupados em unidades conhecidas como lóbulos, cada um deles envolvido por um septo distinto de tecido conjuntivo. Os lóbulos são agrupados em unidades maiores denominadas lobos, que também são rodeados por septos de tecido conjuntivo. Os alvéolos são recobertos por células contráteis de natureza mioepitelial e que respondem ao reflexo de ejeção do leite. As células mioepiteliais também se localizam ao longo dos ductos, contribuindo para a ejeção (BRAGULLA; KÖNIG, 2004; BARTOL et al., 2013). Perto da abertura do mamilo, os ductos galactóforos encontram-se dilatados para dar origem aos seios galactóforos. As aberturas externas dos ductos galactóforos são revestidas por epitélio pavimentoso estratificado, formando o mamilo ou teta. Sendo que toda esta estrutura está envolta pelo tecido adiposo. Em ratos os ductos se unem e formam um canal galactóforo único que se abre no mamilo. Em humanos existe a saída de 15 a 25 dutos no mamilo (LEITE et al., 2007).

Desde a concepção a GM passa por cinco fases de desenvolvimento, sendo elas: a embriogênese ou mamogênese; o desenvolvimento puberal; o desenvolvimento da gravidez ou lactogênese (estabelecimento da secreção láctea);

a lactação ou galactopoiese (manutenção da secreção láctea) e a involução, as quatro primeiras fases estão representadas na Figura 1. A embriogênese é iniciada no feto em todas as espécies de mamíferos. Durante esta fase, formam-se as GMs, a partir de uma crista ectodérmica, formando o sistema ductal mamário rudimentar, que está presente no nascimento. Antes da puberdade, o crescimento da GM é apenas isométrico (NEVILLE, 2001; SVENNERSTEN-SJAUNJA; OLSSON, 2005).

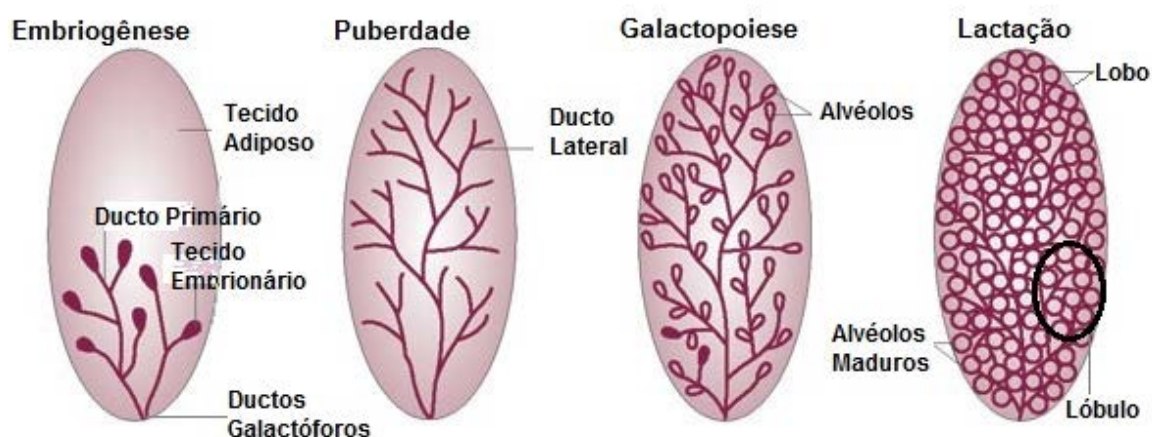


Figura 1 – Desenho esquemático representativo de quatro fases do desenvolvimento da glândula mamária de rato. Adaptado de (HENNIGHAUSEN; ROBINSON, 2005).

Em mamíferos é durante a puberdade que a GM tem seu desenvolvimento principal. As mamas nesta fase estão principalmente sob a ação do estrogênio para a formação dos ductos primários. Entretanto, outros hormônios também são descritos, como o hormônio do crescimento (GH) no desenvolvimento da GM, além dos hormônios tireoidianos, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), que participam da morfogênese e diferenciação da GM de ratas (ANDERSON et al., 2007).

Após a fecundação, na gravidez, a placenta produz estrógenos que estimulam a produção da progesterona e outros hormônios (GH, hidrocortisona e insulina) que coordenam a proliferação celular para o crescimento lóbulo-alveolar e a ramificação dos ductos. Estes hormônios promovem o desenvolvimento do sistema responsável pela secreção do leite, porém inibem, até o nascimento, a secreção do leite. A concentração da prolactina que exerce função importante no crescimento e na diferenciação da GM no sangue da mãe, sobe desde a 5ª semana até ao final da gravidez, quando atinge níveis 10-20 vezes superiores ao basal. Devido aos efeitos supressivos dos estrógenos e progesterona, até ao nascimento, apenas alguns mililitros de líquido é produzido. O líquido secretado nos últimos dias antes do parto

já é o colostro, que contém concentrações de proteínas e glicose semelhantes às do leite, mas contém pouca gordura. Os hormônios tireoidianos, T4 e T3 nesta fase estimulam a síntese e a secreção de α -lactoalbumina (LEITE et al., 2007).

Por fim, após o parto, existe o aumento na expressão de genes de proteínas do leite e enzimas de biossíntese de lipídeos (MARINA et al., 2002). Com a saída da placenta, a taxa de progesterona e hormônios estrogênicos cai subitamente no sangue e eleva-se a taxa de prolactina que é o hormônio essencial para estimular a secreção láctea em todos os mamíferos, exceto dos ruminantes em que o GH domina a galactopoiese (BRAGULLA; KÖNIG, 2004). A histologia da GM de rata está representada na Figura 2.

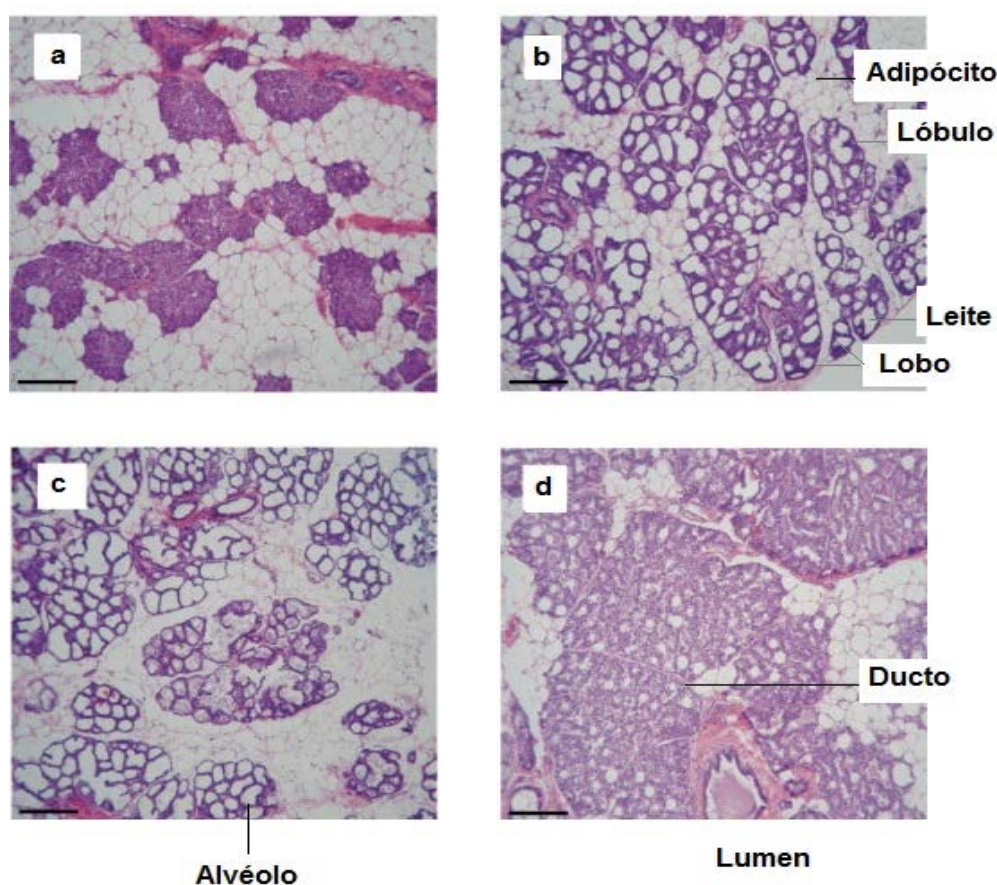


Figura 2 – Fotografias de histologia de glândula mamária de rata corada em H&E. A barra representa 100µm. (a-d) Representação dos períodos de desenvolvimento da mama: aos 15 dias de gestação (a); aos 17 dias (b), 19 dias (c); e final da lactação/involução (d). Adaptado de (LÓPEZ-FONTANA et al., 2012).

Em geral, o leite é secretado continuamente para dentro dos alvéolos, mas não flui livremente para o sistema ductal e chega ao mamilo; para tal, tem que ser ejetado. A ocitocina é o principal hormônio responsável pela ejeção do leite. É um

pequeno peptídeo que além da ejeção de leite, tem numerosas funções relacionadas com a reprodução, bem como da modulação dos comportamentos sociais, reprodutivos e agressivos (ZAGOORY-SHARON et al., 2008). O estímulo dos mecanorreceptores, localizados nas papilas mamárias dos animais, durante o ato da amamentação, propagam impulsos nervosos, até o hipotálamo que seguem para a neuro-hipófise, de onde ocorre a liberação da ocitocina para a corrente sanguínea. A ocitocina se liga aos receptores nas células mioepiteliais e ocorre contração destas e dos alvéolos. Esta contração resulta na expulsão do leite do lúmen alveolar para os ductos mamários. Acredita-se que a insulina atua estimulando a síntese de lipídeos e proteínas enquanto a ocitocina estimula a ejeção do leite (ANDERSON et al., 2007; RUDOLPH et al., 2007).

A PRL é conhecida como hormônio secretado pela hipófise, reguladora da lactação na GM. Porém, descobertas de 2006 revelam que ela é produzida também pelo tecido adiposo como adipocina envolvida nas funções do TA. Biologicamente ativa a PRL é secretada por todos os depósitos de TA examinados: Mamas, visceral e subcutâneo. A expressão da PRL adiposa não é regulada pela pituitária, e é alterada pela obesidade (BRANDEBOURG; HUGO; BEN-JONATHAN, 2007). A PRL exerce várias ações fisiológicas em humanos e em roedores. Além do conhecido papel na lactação e reprodução, está surgindo evidências de que a PRL tem papel no balanço energético, pois no tecido adiposo a PRL coordena a adipogênese. Estudo com camundongos deficientes em receptores de PRL forneceram evidências diretas de que a sinalização da PRL está envolvida na regulação do balanço de energia (CARRÉ; BINART, 2013).

Para ser concluída a nutrição, é necessária a sucção dos neonatos e para tanto a GM precisa ter passado pelo desenvolvimento adequado e produzir leite de qualidade e quantidade suficientes. A gravidez é um momento crítico para o desenvolvimento da GM e se ocorrerem danos durante este período, isso pode ter um prejuízo potencial para a sua diferenciação secretória (MIRANDOLA, 2007). Em ratos, o tamanho do alvéolo e o número na GM podem diminuir por problemas maternos como a hipertensão, hormônio placentário insuficiente, obesidade, deficiência de vitamina A e deficiência de zinco (PROBYN et al., 2013).

A regressão pós lactacional, ou involução, ocorre em taxas diferentes em diferentes espécies, mas simultaneamente com a remodelação do tecido e

“rediferenciação” do estroma rico em TA. Assim, a indução à morte celular é coordenada com sinais que asseguram a fagocitose eficaz dos constituintes restantes do leite, permitindo o colapso do tecido e retorno a remodelação da arquitetura (CARRÉ; BINART, 2013). A involução ocorre em duas fases. Foram descritos em experimento com camundongos, que filhotes removidos no pico da lactação e devolvidos à progenitora em até 48 horas resultou em reinício da lactação. Esta é a primeira fase e é reversível, presumivelmente para permitir atrasos na amamentação do neonato. Na segunda fase de involução, que ocorre depois de dois dias de afastamento da mãe e dos filhotes, a lactação não pode recomeçar e a involução progride (WATSON, 2009). Neste estudo, os resultados associam a involução com a resposta inflamatória de fase aguda, que se caracteriza pela migração de leucócitos, embora a transdiferenciação celular não esteja associada com infecção (WATSON, 2009).

Outro estudo afirma que a involução da GM, assim como a obesidade, se assemelha a um processo inflamatório. Ainda afirma que enzimas e receptores que regulam a involução se apresentam significativamente aumentados na glândula de animais sujeitos a alimentação com alto teor de gordura (HERNANDEZ et al., 2012).

2.1.3 Composição do Leite

Três frações podem influenciar a composição do leite, sendo essas frações classificadas em: emulsão, suspensão e solução. A fração emulsão corresponde à fase lipídica do leite, na qual se concentram os óleos, as gorduras, os ácidos graxos livres (AGL), as vitaminas e demais constituintes lipossolúveis. Os lipídeos são a fonte principal de calorias (energia) aproximadamente 45 a 55% do valor calórico total do leite, constituídos principalmente de triglicerídeos (TG), representando 98 a 99% da gordura total. Porém um novo caráter tem sido associado às lipoproteínas do leite, o seu papel protetor (ASSUMPÇÃO et al., 2004). Além, de servirem como fonte de pronta energia, alguns ácidos graxos de cadeia média, do leite, quando ingeridos, reduzem os processos de inflamação no intestino. Quando ligados a receptores na membrana celular eles têm atividades biológicas similares aos agentes antimicrobianos contra vários microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus envelopados. No contexto do leite, estudos apresentam o ácido palmítico como

tendo importante papel na promoção do metabolismo de lipoproteínas e a regulação da biossíntese das lipoproteínas no fígado em bebês (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006; RUDOLPH; NEVILLE; ANDERSON, 2007; GERMAN; DILLARD, 2010). Na Tabela 1 estão os dados comparativos da composição do leite, entre roedores e humanos.

Tabela 1 – Componentes do leite em roedores e humanos.

Componentes	Roedores	Humano
<i>Gordura (%)</i>	30	4,0
<i>Lactose (%)</i>	5	6,9
<i>Proteína (%)</i>	12	1,2
<i>Calorias (kcal/mL)</i>	140	70

Adaptado de Ribeiro (1997); Park et al. (2007); Almeida (2009).

O leite humano contém de 3 a 5% de lipídios, dentre os quais 98% são de triacilgliceróis, 1% de fosfolipídios e 0,5% de esteróis. O leite humano ordenhado contém, aproximadamente 4,0 g de gordura/100mL e 70,0 Kcal/100mL. Os ácidos graxos saturados do leite humano constituem cerca de 41%, sendo predominante o ácido palmítico. Dentre os insaturados, o oléico e olinoléico estão presentes em maior quantidade (SILVA et al., 2007). No estado alimentado, sob condições de dieta rica em gorduras, os lípideos, sob a forma dos quilomicrons, são transferidos para a célula secretora do alvéolo mamário para a síntese dos TG. No entanto durante um estado de jejum, os ácidos graxos continuam a ser derivados do plasma, mas agora oriundos do fígado como as Lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) ou AGL, derivados do tecido adiposo, transportados no plasma pela albumina até a GM. Em animais alimentados com uma dieta de baixo teor de gordura uma proporção maior dos ácidos graxos para a síntese de TG são derivados da glicose por vias de síntese dos ácidos graxos (ANDERSON et al., 2007; RUDOLPH; NEVILLE; ANDERSON, 2007). Os depósitos de gordura normalmente acumulados durante a gravidez constituem uma importante fonte de PUFA (ácidos graxos poli insaturados) para a síntese do leite durante a lactação. Portanto, alterações mostradas no plasma de ratos lactentes podem ser uma consequência da mobilização de suas próprias reservas de gordura, a fim de fornecer a seus filhos uma composição de leite adequada mesmo com uma dieta hipocalórica (ASSUMPÇÃO et al., 2004; PRIEGO et al., 2013).

A fração suspensão refere-se a porção branca suspensa do leite humano, na qual estão as proteínas e quase a totalidade do cálcio e do fósforo que se encontram presentes na forma micelar, constituindo uma suspensão coloidal na água. Composta pelas proteínas do soro: α -lactoalbumina, lactoferrina, imunoglobulinas, albumina, além da caseína. Mães com dieta hipoproteica geram animais desnutridos que apresentam menor ganho de peso, 50% para as fêmeas e de 53% para os machos até o 10º dia de lactação (DESAI; BABU; ROSS, 2007). A desnutrição perinatal é um dos fatores ambientais mais bem estudados como indutor de plasticidade fenotípica. Em humanos têm sido demonstrado que a desnutrição perinatal aumenta a predisposição do indivíduo a desenvolver doenças cardiovasculares e fatores de risco associados, como hipertensão arterial, resistência à insulina, hiperlipidemia e obesidade (DESPRÉS et al., 2008). Em ratos, foi demonstrado que restrição alimentar (30% - 50% da ingestão do controle) ou dieta hipoprotéica (8% de caseína) no período perinatal parecem provocar deficits no desenvolvimento do cérebro, no tamanho do encéfalo, número de neurônios, aprendizagem e memória (TZSCHENTKE; PLAGEMANN, 2006; PEREIRA, 2009).

A fração solução inclui todos os constituintes hidrossolúveis, vitaminas, minerais, carboidratos, enzimas e hormônios estão somados à água. Juntos representam aproximadamente 87,5% da sua composição. O principal carboidrato presente no leite é a lactose que está presente em diferentes concentrações (RIBEIRO, 2009). Em leite humano são cerca de 130 oligossacarídeos diferentes (MCCLELLAN; MILLER; HARTMANN, 2008). A lactose fornece 42% da energia na dieta e gradiente osmótico para a formação da fase aquosa do leite (VORBACH; CAPECCHI; PENNINGER, 2006). As células secretoras de lactose iniciam a síntese de uma proteína do leite original, α -lactalbumina, no retículo endoplasmático rugoso (ZHAO; CHI; CAO, 2010) A α -lactoalbumina é então transportada para o aparelho de Golgi. A proteína transmembrana no Golgi se liga à UDP-galactose, produzindo uma mudança conformacional que permite que α -lactoalbumina seja convertida em lactose (BRANDEBOURG; HUGO; BEN-JONATHAN, 2007).

Os minerais são importantes para o crescimento, o desenvolvimento e manutenção da saúde dos tecidos corporais (sódio, potássio, cálcio, magnésio e fósforo, entre outros microelementos ou elementos traços, como o cobalto, cobre, iodo, flúor, molibdênio, selênio, cromo, ferro, zinco e outros). As necessidades do

organismo para os macromelementos são relativamente elevadas, enquanto que para os elementos traços, são baixas. As principais vitaminas presentes no leite são: A, B1, B2, B6, C, E, K, niacina e ácido fólico. Em condições normais, as concentrações mostram-se adequadas às necessidades dos lactentes, embora possa variar com espécie e a nutrição materna. Dentre os fatores que podem influenciar tanto na composição quanto no volume da secreção láctea, destacam-se: os genéticos, a reposição hídrica e fase de lactação. (ANDERSON et al., 2007; RUDOLPH et al., 2007).

A amamentação ganhou papel de destaque nos últimos 20 anos no combate à obesidade e suas consequências, conforme a declaração de Plagemann e Harder (2005):

"Além de seu papel importante para a ligação mãe-filho, a amamentação, em comparação com fórmula, tem um considerável número de efeitos positivos a curto e longo prazo sobre o desenvolvimento humano, como uma diminuição da incidência de infecções respiratórias altas, um menor risco de asma e diminuição do risco de hipertensão arterial, diabetes tipo 2, bem como diabetes tipo 1. Além disso, existe evidência profunda de que a amamentação tem o potencial de diminuir permanentemente o risco, em longo prazo, do desenvolvimento da obesidade..."

Segundo Neville et al (2012) devido ao fato, da amamentação desempenhar papel fundamental na regulação e desenvolvimento das redes neurais do recém nato, é que têm sido estudadas as trocas dinâmicas que existem entre a mãe e sua prole. Dados atuais indicam que o leite não é só importante para a proteção e nutrição do recém nascido, mas tem relevância devido sua constituição interferir na homeostase energética por toda a vida do indivíduo.

2.2 HOMEOSTASE

A homeostase é definida como processo de manutenção da constância do equilíbrio do meio interno em relação às oscilações do ambiente externo de um sistema ou organismo (GUYTON; HALL; GUYTON, 2006). A aquisição de energia e sua distribuição é um processo que sustenta a homeostase metabólica. Por meio do processo da ingestão alimentar os organismos vivos adquirem formas

macromoleculares de fontes energéticas, que são decompostas, por reações químicas enzimáticas catabólicas, em monômeros que podem ser usadas como fontes de energia celular (MADONNA et al., 2013). Por outro lado, dentro do organismo, as reações anabólicas promovem a conversão das substâncias simples em estruturas macromoleculares complexas, culminando com o crescimento, regeneração e manutenção de tecidos, órgãos e sistemas. O metabolismo é a soma destas ações antagônicas, catabólicas e anabólicas (HEITMANN et al., 2012). Os processos de síntese e degradação dos nutrientes visam a manutenção do constante equilíbrio da homeostase energética que em última instância determinam a composição do peso corporal (HEITMANN et al., 2012; KITZINGER; KARLE, 2013).

Dois sistemas são centrais na manutenção da homeostase energética, o sistema nervoso central (SNC) e o sistema endócrino (SE). Promovendo a interação entre estes dois sistemas está o hipotálamo, uma região cerebral com intensa comunicação metabólica e hormonal com os diversos sistemas fisiológicos periféricos (HETHERINGTON; RANSON, 1940; ELMQUIST; ELIAS; SAPER, 1999; PEREIRA, 2009).

2.3 SISTEMA NERVOSO CENTRAL - Homeostase Energética

O SNC é dividido, anatômica e funcionalmente, em dois: Sistema Nervoso Autônomo (SNA) e Sistema Nervoso Voluntário ou Somático. O SNA, que comanda as funções vegetativas, por sua vez, também pode ser subdividido em duas partes: O Sistema Nervoso Simpático (SNS) e o Sistema Nervoso Parassimpático (SNP), que possuem funções opostas, principalmente no que se refere ao gasto energético (SCHWARTZ et al., 2000). O ramo simpático estimula o gasto energético com efeito catabólico e prepara o organismo para luta e fuga. O ramo parassimpático regula o armazenamento de energia, promovendo em geral efeitos anabólicos, vegetativos associados à conservação e à restauração energética (SCHWARTZ et al., 2000; GUYTON; HALL; GUYTON, 2006). Ao equilíbrio desta regulação chama-se homeostase energética (BARTOL; WILEY; BAGNELL, 2008). Além dos efeitos autonômicos, o equilíbrio energético também depende de uma rede de sinalização neuro hormonal, a qual engloba sinais fisiológicos provenientes: do trato

gastrointestinal; do tecido adiposo; das glândulas endócrinas e aqueles oriundos dos nutrientes circulantes (SCHWARTZ et al., 2000). Todos estes sinais são integrados pelo SNC, e direta ou indiretamente, são modulados nas redes neurais do hipotálamo, pelas quais serão enviadas as respostas adequadas ao ajuste metabólico necessário para definir o peso corporal (PEREIRA et al., 2006; BAYS et al., 2008).

O hipotálamo é uma pequena parte do diencefalo, ao redor do terceiro ventrículo e é o principal local de interação entre fatores de origem central e periférica da regulação da homeostase energética (MORRISON et al., 2008). Dentre as ações do hipotálamo, destaca-se seu papel no controle da ingestão alimentar, regulando os processos de fome e saciedade. Isto foi demonstrado através de estudos de lesões em algumas regiões do hipotálamo de ratos. As lesões na área ventromedial causavam hiperfagia e obesidade (HETHERINGTON; RANSON, 1940). O hipotálamo é formado por mais de 40 núcleos, que são conjuntos de neurônios responsáveis pelas funções fisiológicas. No que se refere ao metabolismo energético foram destacados: o hipotálamo anterior (HA); o núcleo paraventricular (NPV); hipotálamo dorsomedial (HDM); hipotálamo ventromedial (HVM); o núcleo arqueado (ARQ); o núcleo supraóptico (NSO) e o hipotálamo lateral (HL) como os centros reguladores energéticos (SNITKER et al., 2000). Estudos subsequentes apontaram o ARQ como centro integrador dos demais centros, sendo o principal responsável pela homeostase energética (NISWENDER; BASKIN; SCHWARTZ, 2004).

Quando existe uma diminuição das reservas nutricionais o desejo de ingerir alimentos - o apetite - torna-se uma necessidade, que passa a ser denominada “fome”. Quando a alimentação produz o desaparecimento do desejo ou da necessidade de ingerir alimentos a este estado é denominado “saciedade” (CINGOLANI; HOUSSAY, 2004; GUYTON; HALL; GUYTON, 2006). Sinais de fome podem ser gerados em órgãos periféricos, como a grelina, hormônio liberado pelo estômago no estado vazio, mas a maioria deles são expressos no hipotálamo (KOJIMA et al., 1999). Sinais de saciedade, como a colecistoquinina (CCK), Peptídeo similar ao Glucagon 1 (GLP1), peptídeo YY e são liberados a partir do trato digestivo, em resposta, tanto calórica quanto volumétrica, à ingestão de alimentos em uma refeição (DRUCKER, 2013). A leptina e insulina, são mobilizados, em resposta a alterações no estado nutricional (SCHWARTZ et al., 2000). Porém,

alimentos palatáveis, ou seja, alimentos ricos em gordura e açúcar, aumentam a expressão de sinais de fome e ao mesmo tempo, atenuam a resposta aos sinais de saciedade, o que ajuda a explicar o problema crescente da obesidade em todo o mundo (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

O ARQ é o núcleo que possui dois grupos de neurônios de primeira ordem, que expressam receptores para insulina, leptina, grelina e para outros sinais de saciedade/fome ou obesidade (NISWENDER; BASKIN; SCHWARTZ, 2004) (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). Estes neurônios enviam suas projeções para áreas cerebrais relacionadas ao consumo de alimentos e ao gasto energético, onde liberam seus neuropeptídeos (neurotransmissores). Portanto o ARQ é considerado núcleo central no controle energético (FRIEDMAN; HALAAS, 1998; ELMQUIST; ELIAS; SAPER, 1999; KERSHAW; FLIER, 2004; RIBEIRO, 2009). Um dos grupos de neurônios do ARQ co-expressam neuropeptídeo Y (NPY) e proteína agouti relacionada (AgRP) com ação anabólica ou orexigênica e o outro grupo de neurônios, de ação catabólica ou anorexigênica, expressam pró-opiomelanocortina (POMC) que é precursor do hormônio estimulante de melanócito α (α -MSH) e do Transcrito relacionado à Anfetamina e Cocaína (CART). Ambos os grupos de neurônios respondem à insulina e leptina, mas fazem de maneira oposta (RIBEIRO, 2009; PEREIRA, 2009). Sendo que na presença de insulina ou leptina os neurônios do NPY/AgRP são inibidos para liberação de seus neurotransmissores, enquanto os neurônios POMC são estimulados. Na ausência destes hormônios há a liberação dos neurotransmissores dos neurônios NPY/AgRP, em contrapartida ocorre a inibição do POMC, conforme representado na Figura 3 (BARSH; SCHWARTZ, 2002).

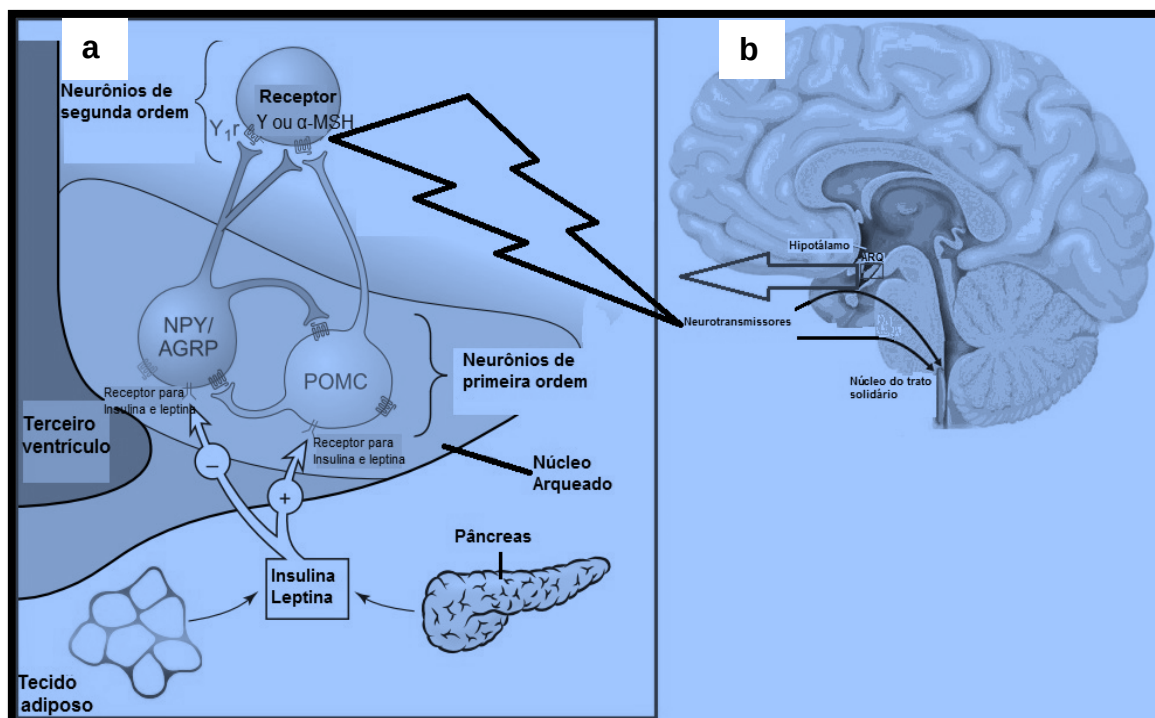


Figura 3. Representação esquemática da ampliação do ARQ e sua localização no encéfalo. A figura 1a mostra esquematicamente o ARQ com seus neurônios, que expressam receptores de insulina e leptina para promover a regulação da homeostase energética através da integração com estes sinais periféricos. Ambos os neurônios respondem à insulina e leptina, mas atuando de maneira oposta. Via inibição dos neurônios que, expressam NPY/AgRP ou ativação dos que expressam POMC. **b.** Corte transversal do Encéfalo, selecionando o ARQ do Hipotálamo. Adaptado de (BARSH; SCHWARTZ, 2002).

Estudos recentes indicam claramente que o futuro metabólico de um indivíduo pode ser programado em estágios de desenvolvimento. Por exemplo, filhos de mães diabéticas têm um maior risco de se tornarem obesos e diabéticos na vida adulta (RODRIGUES, 2010). Estudos em animais demonstraram que a hiperinsulinemia e/ou hiperglicemia, durante a vida perinatal podem prejudicar permanentemente a organização e a função das redes do hipotálamo que controlam o apetite e a homeostase da glicose, levando-os à obesidade por hiperfagia (PATEL; SRINIVASAN, 2011).

Durante a lactação diversas alterações no metabolismo são requeridas para garantir a homeostase energética da mãe e de sua prole. A lactação é caracterizada pelo aumento de NPY/AgRP no HDM, que é importante modulador da hiperfagia associada à lactação (SÁNCHEZ-MUNIZ; GESTEIRO; BASTIDA, 2012). De acordo com a literatura, a hiperfagia na lactação também é reforçada pela queda da sensação de saciedade, que ocorre pela redução dos níveis de CCK. As mudanças atingem o SNS, promovendo a redução do gasto energético nos tecidos não mamários, canalizando as energias para a amamentação (ZAGOORY-SHARON et

al., 2008). Estas alterações no controle alimentar, características da lactação, são acompanhadas de alterações no metabolismo materno, em especial o controle glicêmico.

2.4 METABOLISMO DA GLICOSE

Os carboidratos constituem a mais importante fonte de energia dos mamíferos, sendo o principal carboidrato a glicose. O nível de glicose na circulação sanguínea depende de fonte exógena (alimentos) e/ou de fonte endógena (glicogenólise e gliconeogênese) para se manter constante inclusive nos períodos interdigestivos e em condição de jejum (MADONNA et al., 2013).

Por suas características físico-químicas, a glicose necessita de transportadores específicos, para atravessar a bicamada lipídica que compõe a membrana celular. Os transportadores de glicose (GLUT) são proteínas integrais de membrana que permitem a passagem da glicose por difusão facilitada. Já foram descritas, em humanos, 14 tipos diferentes de GLUT, de 1 à 14 (MUECKLER; THORENS, 2013). Cada GLUT possui características funcionais e distribuição tecidual diferente, sendo o transporte bidirecional (entrada ou saída da célula) dependente do gradiente de concentração (WOOD; TRAYHURN, 2003; MUECKLER; THORENS, 2013).

Os transportadores mais abundantes são GLUT1, 2, 3 e 4. O GLUT1 é predominante em tecido embrionário/fetal, mas presente em pequena quantidade no pós-natal em todos os tecidos, pois este transportador é responsável pela captação basal de glicose. O GLUT2 está presente em hepatócitos, células β pancreáticas, mucosa intestinal e rins. O GLUT3 está presente no cérebro e na placenta. Estes três transportadores estão constitutivamente, expressos na superfície das células respectivas, são classificados como transportadores independentes da insulina, mantendo o aporte energético destes tecidos, livre e continuamente (MUECKLER; THORENS, 2013). O GLUT4 é abundante no tecido adiposo e nos músculos esquelético e cardíaco. Estes tecidos são denominados insulino-dependentes, porque dependem da presença e ligação do hormônio insulina ao seu respectivo receptor para que ocorra a captação de glicose. Nestes casos, quando a insulina liga no receptor, este emite sinais, para que os GLUT4 sejam translocados do espaço

intra para o extracelular, para então permitir o acesso da glicose à célula (WOOD; TRAYHURN, 2003).

Os tecidos insulinodependentes são responsáveis pela rápida captação e armazenamento da glicose pós-prandial, para a manutenção da homeostase glicêmica. Após a sinalização da insulina, a célula produz, conseqüentemente, o aumento imediato em 10 a 20 vezes do transporte da glicose para o interior da célula para estocá-la ou consumi-la (MUECKLER; THORENS, 2013). A captação de glicose dependente de insulina é um mecanismo seletivo e controlado, importante para a redução da glicemia pós-prandial, para coordenar a formação de reservas, porém é ainda mais necessário para sempre permitir a livre captação da glicose, primeiramente pelos órgãos essenciais, em particular o tecido neural (MACHADO, 1998; WOOD; TRAYHURN, 2003; MUECKLER; THORENS, 2013).

A glicose é fundamental para o metabolismo celular, deste modo a manutenção da glicemia dentro de valores adequados é um processo central no metabolismo energético. A hipoglicemia, glicemia abaixo de 60mg/dL, mesmo que por um período pequeno de tempo, pode ocasionar confusão, convulsão até mesmo coma. Por outro lado, a hiperglicemia repetida e persistentemente, valores acima de 200mg/dL, pode provocar diurese osmótica, que pode levar a desidratação severa, hipertensão, colapso vascular e arritmia cardíaca (MA; ZHU, 2013). Diabetes mellitus (DM) é a patologia caracterizada pelo desequilíbrio da homeostase glicêmica, situação em que o indivíduo fica sujeito diariamente ao risco, tanto de ter hiper quanto hipoglicemia, mesmo sob tratamento. Diversos estados patológicos rompem a homeostase energética, dentre os quais se destaca a DM2 que atualmente é considerada uma epidemia, intimamente ligada ao avanço da obesidade (GUILHERME et al., 2008; MUOIO; NEWGARD, 2008).

Desde o início da lactação, ocorrem alterações para suprir as demandas glicêmicas mamárias, então a síntese da glicose hepática é aumentada no primeiro dia ou ainda quando o fornecimento de substrato alimentar é inadequado. Ao mesmo tempo, a utilização da glicose pelo tecido adiposo e muscular é reduzida e ocorre um aumento da captação da glicose pela glândula mamária, mudanças que estão relacionadas à expressão de GLUT4 pelos tecidos, para manter o aporte energético do leite (BURNOL et al., 1986). Sendo a sinalização da PRL responsável pela diminuição da expressão de transportador mRNA GLUT4 nos tecidos insulinodependente, que reflete em menor captação de glicose por estes.

2.5 SISTEMA ENDÓCRINO - O Pâncreas no controle glicêmico

O pâncreas apresenta secreção merócrina, isto é, liberada por meio de exocitose, sem perda de material celular e é composto por dois tipos de glândulas: glândula exócrina, que secreta enzimas digestivas no lúmen intestinal e glândula endócrina, que secreta hormônios na corrente sanguínea. A glândula endócrina é caracterizada por agregados celulares, denominados Ilhotas de Langerhans (PIPELEERS; MAES; VAN DE WINKEL, 1982; DRAZNIN; MELMED; D, 1989; SANDER; SHIH; WANG, 2013). As ilhotas de Langerhans são muito vascularizadas, distribuídas por toda a porção exócrina do pâncreas e constituída por quatro principais tipos de células secretoras: células Alfa (α) que secretam glucagon; células Beta (β) que secretam insulina, pro-insulina, amilina e peptídeo de conexão (peptídeo C); células Delta (δ) que secretam somatostatina; as células F ou PP que secretam polipeptídeo pancreático (PP) por fim (PIPELEERS; MAES; VAN DE WINKEL, 1982; CINGOLANI; HOUSSAY, 2004; GUYTON; HALL; GUYTON, 2006; SANDER; SHIH; WANG, 2013).

A insulina é o hormônio, de secreção regulada, mais importante para o controle glicêmico. O estímulo principal para sua secreção é a glicose, porém outros nutrientes também são capazes de produzir estímulo, como aminoácidos e lipídeos (SALTIEL; KAHN, 2001). A insulina é responsável pela captação da glicose pelos tecidos adiposo e muscular esquelético, que juntos representam a maior massa tecidual do corpo humano e mantêm os valores da glicemia entre 70 e 110 mg/dL em situação de jejum (DIMITRIADIS et al., 2011). Após uma refeição rica em carboidratos a concentração da glicose aumenta para valores entre 150 mg/dL até 200 mg/dL. A produção, secreção e concentração plasmática de insulina aumentam proporcionalmente à glicose, em indivíduos que apresentam tolerância normal à glicose. Os níveis glicêmicos retornam novamente aos de jejum dentro de no máximo duas horas (SALTIEL; KAHN, 2001; DIMITRIADIS et al., 2011; PESCHKE; BÄHR; MÜHLBAUER, 2013).

A principal via de secreção de insulina pelas células β está representada na Figura 4. Nesta via alterações do metabolismo da glicose estão acopladas a

oscilações do potencial de membrana e influxo de cálcio. Pelo papel central dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) ela é também conhecida como via dependente dos canais de K^+_{ATP} . Todavia, existem mecanismos de secreção de insulina que são independente destes canais, que age auxiliando o processo de secreção, através de sinalizações celulares e fosforilações (WOOD; TRAYHURN, 2003; SANDER; SHIH; WANG, 2013). Adicionalmente, os subprodutos da glicólise também ativam uma série de mensageiros intracelulares, responsáveis pela regulação da secreção da insulina, os quais participam da sinalização celular e síntese de mais insulina (RORSMAN; BRAUN, 2013).

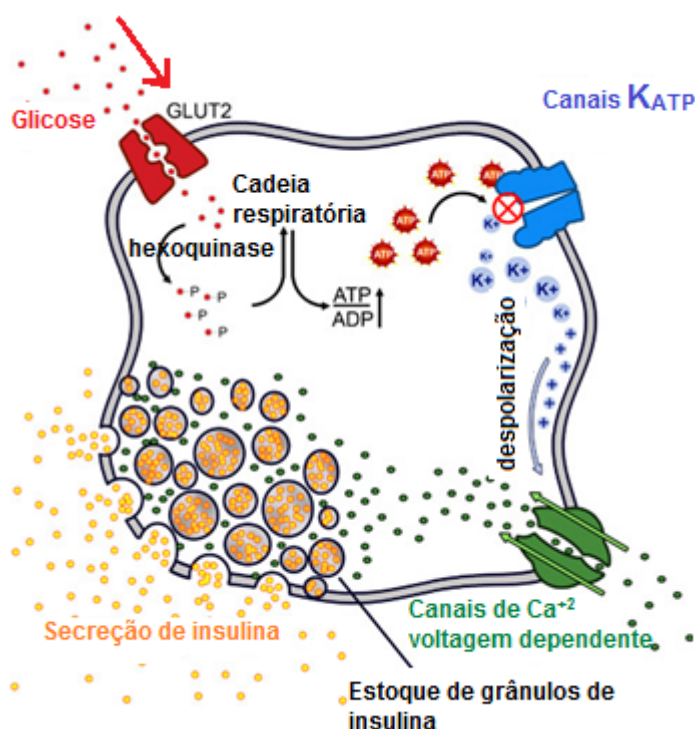


Figura 4 - Representação da secreção de insulina pela célula β . Esta via é dependente dos canais de K^+ . A glicose entra na célula via GLUT2, é fosforilada pela hexoquinase, segue pela cadeia respiratória aumentando a razão ATP/ADP. Este aumento de ATP inativa os canais de K^+ sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}), despolariza a membrana da célula causando a abertura dos canais de Ca^{2+} . O influxo deste íon culmina com a exocitose dos grânulos de insulina na corrente sanguínea. Adaptado de (ASHCROFT; RORSMAN, 2012).

O refinamento do controle secretor de insulina estimulado pela glicose é executado pela modulação autonômica sobre o pâncreas endócrino. As células β pancreáticas são intensamente inervadas por ambas as subdivisões autonômicas. Os neurônios pós-ganglionares do ramo autonômico, parasimpático e simpático, liberam seus neurotransmissores, acetilcolina (ACh) e noradrenalina, respectivamente, nas inervações do pâncreas (MADONNA et al., 2013). A ACh via

receptores muscarínicos potencializa a secreção de insulina, enquanto a noradrenalina, bem como seu hormônio análogo, a adrenalina age inibindo a secreção de insulina via receptores alfa adrenérgicos (RORSMAN; BRAUN, 2013) .

DM é a doença metabólica, com etiologias diversas, caracterizada por hiperglicemia, principalmente em jejum, com níveis acima de 110mg/dL, que resulta da deficiência na secreção de insulina pelas células β , resistência à ação da insulina ou ambas (ASHCROFT; RORSMAN, 2012). DM tipo 1 (DM1) é caracterizada pela absoluta deficiência na produção de insulina, decorrente, na grande maioria dos casos, de uma destruição autoimune das células β . Pode surgir em qualquer idade, mas predomina em crianças, adolescentes e adultos jovens (SANDER; SHIH; WANG, 2013). DM2 é caracterizada por alterações que levam à hiperglicemia devido a um mecanismo de bloqueio da ação da insulina, tanto nos receptores de insulina, quanto na sua via de ação e sinalização nos tecidos alvos (ASHCROFT; RORSMAN, 2012). Algumas das principais alterações fisiopatológicas responsáveis por DM2 são "decorrentes" da obesidade que levam à RI, hiperinsulinemia, intolerância à glicose, dislipidemia e leptinemia (GUILHERME et al., 2008). A hipersecreção da insulina frequentemente induz às alterações na histomorfologia das ilhotas de Langerhans. Diante da maior demanda da insulina as ilhotas hipertrofiam para promover consequente aumento na produção insulínica (GALLAGHER; LE ROITH, 2013). Em geral ocorre a redução em número, mas aumento no tamanho das ilhotas pancreáticas, apresentando tanto a densidade quanto volume significativamente aumentados, seguida de falência das ilhotas por sobrecarga de trabalho. Consequentemente, na DM2 os tecidos insulínica não conseguem captar a glicose (COTRAN; ROBBINS, 2000; HARISHANKAR et al., 2011; GALLAGHER; LE ROITH, 2013).

Alterações na secreção de insulina no sexo feminino ocorrem durante a gravidez, mas logo após o parto a secreção de insulina retorna gradativamente aos níveis normais, desaparecendo a hipertrofia das ilhotas comum na gestação (BARBOUR et al., 2007). Durante a lactação, o pâncreas sofre diminuição tanto do tamanho quanto na densidade devido à redução da atividade secretória das células β . Segundo estudos em roedores os menores níveis circulantes de secreção de insulina estão associados à lactação quando comparados os períodos não gestacionais, gestacionais, pós-natais com lactação (BURNOL et al., 1986). O decréscimo da atividade secretória das ilhotas na amamentação, quando comparada

às ratas não lactantes, pode estar ligado em parte ao decréscimo do conteúdo de cálcio nas ilhotas, durante a lactação, causado pela demanda aumentada de cálcio para a produção de leite. (MARYNISSEN; MALAISSE; VAN ASSCHE, 1987; BARBOUR et al., 2007).

2.5.1 Via de Ação da Insulina

A insulina possui função anabólica, sendo o indicador celular para síntese de carboidrato, gordura e proteína. No tecido adiposo e muscular o principal efeito da insulina é a translocação do GLUT4, aumentando a taxa de transporte e lise de glicose na célula (NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011). Também diminui a taxa de degradação de glicogênio no músculo e fígado. Diminui a taxa de lipólise e aumenta a lipogênese no tecido adiposo e portanto, diminui o nível de ácidos graxos no plasma e aumenta a absorção de triglicérides do sangue para tecido adiposo e muscular (SALTIEL; KAHN, 2001). No músculo diminui a velocidade de degradação de proteínas, além de ser responsável em todo o organismo pela diferenciação, proliferação celular entre outras funções (CINGOLANI; HOUSSAY, 2004; DIMITRIADIS et al., 2011).

O Receptor de Insulina (IR - do inglês *Insulin Receptor*), pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que tem atividade tirosina quinase intrínseca. IR é uma proteína heterotetramérica, composta por duas subunidades α , na face externa da célula e duas subunidades β , que transpassam a membrana até a face interna da célula (SALTIEL; KAHN, 2001).

A sensibilidade celular à insulina é determinada não apenas pelo número e afinidade aos seus receptores, mas também pelo estado funcional das vias de sinalização intracelulares de cada tipo celular. A integridade desta via de sinalização é responsável pela resposta celular à presença da insulina (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Embora a insulina não apresente uma ação direta na captação de glicose em tecidos, como os do cérebro e fígado, ela influencia indiretamente a taxa de utilização da glicose ou outros substratos neles. Com o uso das vias de fosforilação e transcrição descritas na figura 5, é que a insulina é capaz de acionar no fígado a formação de glicogênio (gliconeogênese) e inibir a glicogenólise hepática (NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011). No SNC estas vias de

sinalização da insulina agem como reguladores da ingestão alimentar controlando a vontade de comer (WHITEHEAD et al., 2000; CINGOLANI; HOUSSAY, 2004; DIMITRIADIS et al., 2011).

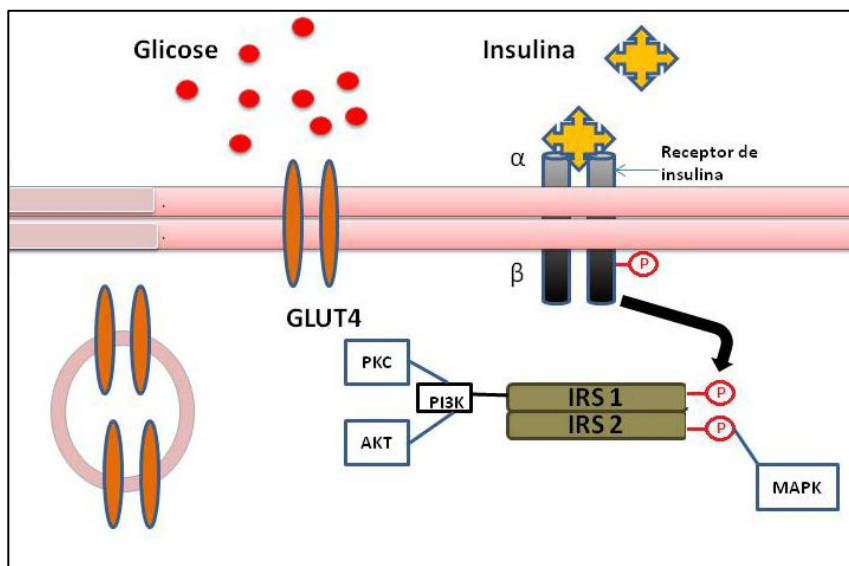


Figura 5 - Vias da fosforilação e transcrição da insulina. A insulina, ao se ligar na subunidade α do seu receptor (IR) da membrana da célula alvo, ativa a ação catalítica da subunidade β que por sua vez, catalisa sua autofosforilação, tornando-o apto a recrutar substratos intracelulares e fosforilá-los nos resíduos de tirosina, ativando proteínas da família dos substratos do receptor de insulina (IRS -1 ao IRS-4). Cada um quando ativado, dá continuidade e amplitude ao sinal da insulina e ativam enzimas fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que em seguida ativam Akt, e PKC, ou Proteinoquinase ativada por mitógeno (MAPK). Dependendo da via de sinalização e da célula estimulada, estas reações regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, expressões gênicas específicas do metabolismo da glicose ou inespecíficas (SALTIEL; KAHN, 2001).

Porém, problemas com a sinalização da insulina podem ocorrer frequentemente na obesidade pelo desequilíbrio metabólico do tecido adiposo e são responsáveis pelo evento chamado RI que é a primeira e principal característica da SM (MUOIO; NEWGARD, 2008).

A RI pode ocorrer em várias condições fisiológicas além da obesidade, como acontece no período gestacional e parcialmente no período lactacional (BARBOUR et al., 2007). Um estudo com ratas durante a lactação relatou hipersensibilidade sistêmica à ação da insulina, porém, no tecido adiposo e muscular com sensibilidade reduzida, retornando ao normal após o desmame de maneira gradual (BURNOL et al., 1986; BUCHANAN et al., 2007; LIRA; DIMENSTEIN, 2010). Atualmente é também reconhecida a ação da insulina para a lactação, pois ela é responsável pela diferenciação celular da GM durante a gestação (NEVILLE et al., 2013). Finalmente, a insulina é o principal hormônio lipogênico e regulador da homeostase glicêmica,

modulações na sua ação são fundamentais para o controle do metabolismo de lipídios e carboidratos, essenciais no processo de síntese de leite (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006; DIMITRIADIS et al., 2011).

2.6 TECIDO ADIPOSEO

Ao TA estão associadas várias funções, entre elas: armazenamento de energia, regulação hormonal dos sistemas homeostáticos, termogênese, barreira física ao trauma, proteção contra o impacto para as vísceras e isolamento térmico. É principalmente conhecido como reservatório energético por sua capacidade especializada em armazenar lipídeos (triacilgliceróis) em suas células (adipócitos), funcionalmente o TA não é mais considerado apenas como um tecido inerte, mas está emergindo como participante ativo na regulação de processos fisiológicos e patológicos, incluindo a imunidade e a inflamação (KERSHAW; FLIER, 2004). O TA produz e libera uma variedade de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (HOTAMISLIGIL, 2006).

O SNA atua diretamente e indiretamente sobre o TA. Quando o SNS é ativado, pela leptina ou insulina, promove ações catabólicas de lipólise e termogênese, por meio da liberação de noradrenalina e subsequente ativação dos receptores β -adrenérgicos nos adipócitos. Adiciona-se a este efeito lipolítico a ação endócrina da adrenalina durante as ativações do eixo simpatoadrenal (NISWENDER; BASKIN; SCHWARTZ, 2004). Por outro lado, o SNP organiza as ações anabólicas sobre o tecido adiposo indiretamente. A ACh liberada pelos terminais parassimpáticos atua estimulando os receptores muscarínicos no pâncreas, potencializando a secreção de insulina, esta por sua vez estimula a lipogênese por aumentar a captação de glicose e de ácidos graxos no TA (ELMQUIST; ELIAS; SAPER, 1999).

Em mamíferos, existem dois tipos de TA: tecido adiposo branco (TAB) e TAM (GUILHERME et al., 2008; JIALAL, 2013). Estes tecidos diferenciam-se morfológicamente (Figura 6) e funcionalmente, apresentando importantes alterações durante estados especiais, tais como, a lactação conforme descreveremos a seguir.

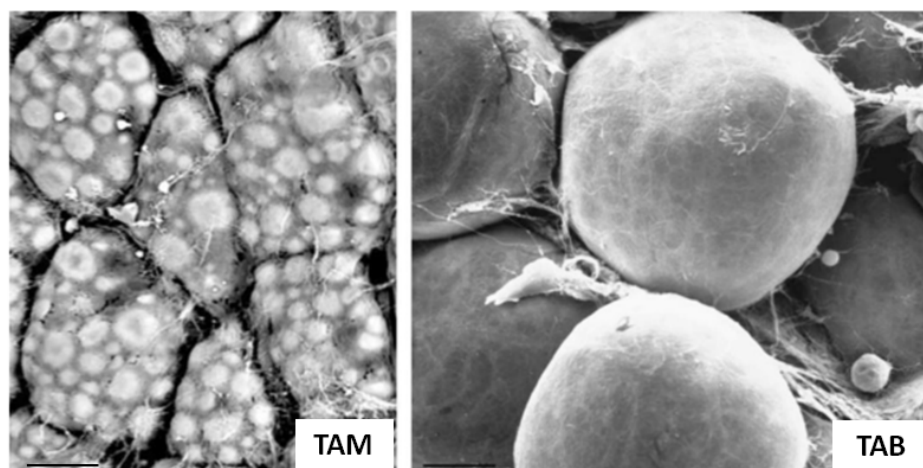


Figura 6 – Micrografia eletrônica de tecido adiposo – Tecido adiposo marrom (TAM) à esquerda e tecido adiposo branco (TAB) à direita. O TAM possui adipócitos com depósitos multiloculares contendo lipídeos e apresenta formato poliédrico, a barra da escala representa 40 μm . No TAB os adipócitos têm formato esférico e o depósito de lipídio é unilocular, a barra da escala equivale a 25 μm (CINTI, 2009).

2.6.1 Tecido Adiposo Branco – TAB

No balanço energético, a energia excedente (não consumida) pode ser estocada como glicogênio (fígado ou músculo esquelético) ou como triacilglicerol (TG) no tecido adiposo (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006). TG é a forma mais eficiente de armazenamento, tanto em termos de quantidade, uma vez que grande volume pode ser armazenado sem ocupar muito espaço, quanto em termos energéticos, uma vez que fornece quatro vezes mais ATP do que os carboidratos. Deste modo, o excesso de calorias ingerida resulta em balanço energético positivo e expansão da massa do TAB (SMORLES et al., 2012). No TAB, os adipócitos armazenam estes ácidos graxos como uma única gota dentro da célula, apresentando capacidade de armazenamento praticamente ilimitada, pela expansão do adipócito (hipertrofia), replicação e diferenciação de pré-adipócitos em novos adipócitos (hiperplasia) (BAYS et al., 2008; SMORLES et al., 2012).

Nas últimas décadas o papel do TAB foi revisto, o que antes era considerado apenas local de armazenamento de gordura, é atualmente considerado o centro de uma rede fisiológica complexa e que participa da regulação de uma grande variedade de funções biológicas. Dentro do contexto metabólico da obesidade destaca-se o papel do TAB como regulador dominante de lipídeos e da homeostase glicêmica. Evidências experimentais, indicam que as disfunções no metabolismo do

tecido adiposo tem impacto direto sobre a homeostase energética, um processo que envolve a produção e liberação de sinalizadores denominados adipocinas, cujo papel será descrito posteriormente (FRÜHBECK, 2008; GUILHERME et al., 2008).

Em condições de balanço energético positivo, a expansão do TAB, ocorre tanto por hipertrofia quanto por hiperplasia. Porém a hipertrofia está mais associada à inflamação do TAB, apresentando a infiltração de macrófagos no tecido adiposo além de outras células do sistema imune como Natural Killer e células T, que tem sido descritas em obesidade tanto em ratos quanto em humanos (HOTAMISLIGIL, 2006). A gordura visceral é considerada a mais sujeita a hipertrofia, inflamação moderada e, portanto, mais diretamente envolvida na instalação da RI e SM. Esta gordura é representada por três depósitos: o retroperitoneal, o perigonadal e o mesentérico. (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; BAYS et al., 2008). Em obesidade, os adipócitos sofrem expansão e secretam mais fatores pró-inflamatórios, provocando a instalação de um processo inflamatório subcrônico. Tais fatores pró-inflamatórios são responsáveis pelo recrutamento e ativação de leucócitos e macrófagos que acentuam o quadro inflamatório da obesidade, que está diretamente relacionado com o desenvolvimento de RI, DM2 e ao risco de doença cardiovascular (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006; LEE, 2013). Estudos sugerem que o adipócito possui um volume de tamanho máximo, que não pode ser ultrapassado. O volume máximo, também referido como o tamanho crítico da célula (TCC), seria determinado geneticamente e específico para cada depósito. Assim, os adipócitos crescem em volume e podem chegar até o tamanho máximo crítico, situação que provavelmente induz ao estresse celular relacionado com hipóxia, levando à morte celular (CINTI, 2009). Similarmente, também está bem estabelecido que o tipo de depósito do TAB determine o grau de RI e suas complicações. Dentro deste contexto, o acúmulo de gordura visceral é importante em termos clínicos, uma vez que, está mais intimamente associado com SM e o DM2 (RUSSELL et al., 2007). Conforme demonstram estudos em roedores e humanos obesos, a gordura visceral é formada por adipócitos menores do que da gordura subcutânea, porém o tecido é mais infiltrado por macrófagos. Os adipócitos viscerais alcançam o TCC mais cedo que os adipócitos subcutâneos (CINTI, 2009; PATEL; ABATE, 2013).

A lactogênese é acompanhada por alterações no metabolismo do TA, que passa para o estado catabólico durante a lactação, apresentando em diversos

depósitos aumento da lipólise e diminuição da lipogênese. Ocorre o aumento da mobilização dos lipídeos e da utilização das reservas proteicas dos tecidos musculares, como fonte energética para a GM objetivando a lipogênese específica para a produção do leite (CINTI, 2009). A prolactina contribui no metabolismo do tecido adiposo podendo promover a lipólise ou lipogênese simultaneamente. Dependendo dos receptores da prolactina expressos nas células, esta ação é regulada pela insulina (CARRÉ; BINART, 2013). Em estudos realizados com roedores, as ratas lactantes sob condições normais de alimentação apresentaram balanço energético negativo, com mobilização de cerca de 1g de tecido adiposo por dia para suprir as necessidades nutricionais (CARRÉ; BINART, 2013). A lipase de lipoproteína (LPL) é a enzima envolvida diretamente ao catabolismo do TG (NEVILLE; PICCIANO, 1997). Em ratas lactantes LPL está com sua atividade aumentada na GM e reduzida no tecido adiposo. O papel principal da LPL durante a lactação é o redirecionamento dos TG circulantes para a GM para a síntese do leite para garantir a adequada produção do leite para o crescimento normal e desenvolvimento dos filhotes (ASSUMPÇÃO et al., 2004). Deste modo, importantes aspectos funcionais e morfológicos dos adipócitos do TAB podem variar durante a lactação.

2.6.2 TAB e Adipocinas

Adipocinas são hormônios produzidos pelos adipócitos do TAB. Os níveis circulantes das adipocinas são determinados principalmente pela quantidade de massa adiposa. Dentre as principais adipocinas estão a leptina, adiponectina, visfatina, resistina, retinol-binding-protein-4 (RBP4), fatores de complemento B, C3, e D (adipsinas, que são adipocinas com função imunológica), além do inibidor do fator ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) e de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6) (HOTAMISLIGIL, 2006).

A leptina, mais estudada e conhecida como “hormônio da saciedade”, tem como alvo primário o cérebro, atuando nas mesmas regiões hipotalâmicas da insulina (FANTUZZI, 2005; MUOIO; NEWGARD, 2008; RIBEIRO, 2009; RÉ, 2012). A concentração desta adipocina no sangue é diretamente proporcional à quantidade

de adipócitos, porém outros tecidos além do TA expressam leptina, mas em baixa concentração (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

As ações da leptina incluem o aumento do gasto energético e ativação do SNS e diminuição da ingesta alimentar (NISWENDER; BASKIN; SCHWARTZ, 2004). No fígado, a leptina estimula a oxidação de ácidos graxos, captação de glicose pelo aumento da sensibilidade a insulina (KERSHAW; FLIER, 2004). Em tecidos não adipogênicos ela previne a lipotoxicidade (acúmulo de lipídios), aumenta a função imunológica, aumenta a produção de citocinas, a adesão e a fagocitose em macrófagos, além de estimular a proliferação das células T, levando ao aumento da competência imunológica (RÉ, 2012; ECHEVERRY; PENAGOS; RUIZ-CORTÉS, 2012).

Pouco mais de uma década atrás, descobriu-se que o TNF- α e a IL-6 apresentam expressão aumentada no tecido adiposo de modelos animais de obesidade. Esta descoberta foi o primeiro elo molecular entre inflamação e obesidade, atrelando a liberação destas citocinas pelo tecido adiposo (adipocinas) ao quadro inflamatório da obesidade (FANTUZZI, 2005). A IL-6 diminui a sinalização da insulina nos tecidos periféricos, bloqueando a sinalização do IR, consequentemente inibe a adipogênese e diminui a secreção de adiponectina (uma adipocina benéfica). Estes efeitos periféricos da IL-6 são compatíveis com resultados epidemiológicos mostrando elevados níveis desta citocina nos quadros de obesidade e resistência à insulina (FANTUZZI, 2005).

Similarmente, em obesos existe uma forte correlação inversa entre TNF α e metabolismo de glicose, devido também à supressão da sinalização da insulina. Como consequência ocorre aumento da lipólise, que eleva os níveis de AGL na circulação, reduzindo ainda mais a fosforilação em tirosina IRS-1 e também impedindo a fosforilação em sequência da PI3K, que tem como resultado a redução da síntese e translocação do GLUT4 para a membrana (FONSECA-ALANIZ et al., 2007; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). TNF- α é hiperexpresso no tecido adiposo e no músculo esquelético de camundongos e humanos obesos, casos em que há expansão dos adipócitos e que irá desencadear outros sinais que conduzem a quimiotaxia de macrófagos. Embora algumas destas moléculas tenham, sobretudo, ação autócrina ou parácrina, algumas também contribuem significativamente para a inflamação sistêmica (LIU et al., 2013). Assim, particularmente em modelos

experimentais, está evidente que a produção aumentada de TNF α no tecido adiposo, mantém o estado de baixa inflamação crônica que é uma característica importante da obesidade, além de interferir na sensibilidade periférica da insulina e contribuir significativamente para a RI (HOTAMISLIGIL, 2006; CINTI, 2009).

Algumas adipocinas têm papel fundamental na apoptose de células β e, conseqüentemente, na patogênese do DM2. Além da elevação dos níveis circulantes de TNF α e IL-6 em obesos, a hiperglicemia aumenta a expressão de IL-1 dentro das ilhotas de Langerhans no pâncreas de ratos (COSTA; DUARTE, 2006). Estas citocinas ativam serinas quinases como IKK β e JNK também poderão induzir fosforilação em serina do IRS-2, com conseqüente degradação deste substrato, que bloqueia a sinalização da insulina, concomitantemente induzindo apoptose de células β (HOTAMISLIGIL, 2006; SMORLESI et al., 2012).

A redução do tamanho do adipócito também leva a liberação de citocinas, entre as quais se destaca a adiponectina. Esta adipocina circula em altas concentrações no sangue humano e apresenta atividades biológicas benéficas, tais como, eleva a oxidação muscular dos ácidos graxos, reduz a concentração de glicose plasmática e possui funções imunológicas anti-inflamatórias, pois age como fator de proteção cardiovascular e aumenta a sensibilidade à insulina (COSTA; DUARTE, 2006). Ao contrário da maioria das adipocinas, a liberação da adiponectina é inversamente proporcional ao tamanho do TA. Quanto maior o TA menor a expressão de adiponectina (FANTUZZI, 2005). Em situações de equilíbrio da adiposidade, a leptina e adiponectina são classificadas como "anti-diabetogênicas", conforme representado na Figura 7. Deste modo, dependendo do estado funcional e morfológico do TA, as adipocinas podem apresentar efeitos positivos ou negativos sobre o metabolismo energético, em especial sobre a homeostase glicêmica e lipídica (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006; MUOIO; NEWGARD, 2008; GUILHERME et al., 2008).

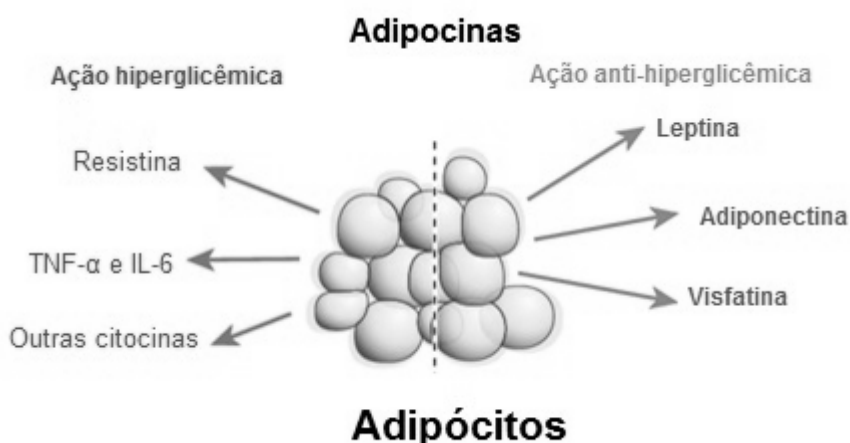


Figura 7 – Adipocinas: à direita da linha central pontilhada, estão as adipocinas com efeitos positivos para o metabolismo da glicose e à esquerda da linha, as adipocinas com ação negativa. Adaptado de (HOTAMISLIGIL, 2006)

A lactação é um período de mobilização do TA e intensa lipólise, assim, os níveis circulantes de leptina durante a lactação são diminuídos ligados a redução dos estoques de gordura. A ausência do efeito de saciedade da leptina contribui para a hiperfagia da mãe, para deste modo evitar o balanço energético negativo na produção do leite (PEDRAZA et al., 2000; VERNON, 2005; ZAGOORY-SHARON et al., 2008). Estudo em vacas indicam que os níveis das adipocinas caem no início da lactação para promover aumento da lipólise e maior mobilização dos depósitos de gordura para suprir a produção de TG no leite (SINGH et al., 2013). Mulheres que amamentam apresentam hipoadiponectinemia devido ao efeito na expressão da PRL na secreção de adiponectina, sendo a PRL que regula a liberação de leptina no tecido adiposo de ratos (BRANDEBOURG; HUGO; BEN-JONATHAN, 2007). É importante salientar que a leptina é conhecida por reduzir a ingestão de alimentos, para induzir a lipólise e inibir a lipogênese (OLLER; ILIC; WILLIAMSON, 1989; CARRÉ; BINART, 2013). Em estudo em ratos Wistar com dieta de alto teor de gordura versus dieta de baixo teor de gordura, os resultados indicaram que o consumo de dieta com alto teor de gordura, danifica o tecido do parênquima mamário e dificulta a sua capacidade de sintetizar e segregar leite. Possivelmente através de um aumento na produção de uma enzima reguladora da serotonina e através da elevação de IL-6 e TNF- α (HERNANDEZ et al., 2012).

2.6.3 Tecido Adiposo Marrom - TAM

Os primeiros estudos sobre TAM relacionaram sua presença em organismos que não tremiam durante a produção de calor para aumentar a temperatura corpórea, caso dos animais hibernantes e filhotes dos mamíferos (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Estudos subsequentes confirmaram que os depósitos de gordura marrom são encontrados em roedores e outros animais, durante toda a vida, com a função de gastar energia com produção de calor sem tremor. Em humanos o TAM foi descrito como abundante somente em lactentes, porém estudos recentes revelam que ele persiste em adultos, disperso pelo corpo, misturado ao TAB e em pequena quantidade (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006; SYMONDS et al., 2012).

Adipócitos marrons são caracterizados por armazenar os ácido graxos em múltiplas pequenas vesículas de TG por célula, para facilitar a lipólise. A principal função do TAM, contrário ao TAB que tem função de guardar energia, é o gasto de energia para cumprir função termorreguladora nos mamíferos, uma adaptação a clima frio, agindo contra a hipotermia e a obesidade. Um alto teor de mitocôndrias e a presença da proteína desacopladora-1 (UCP-1) são as principais características deste tecido. As UCP-1 permitem à célula a utilização da energia derivada da oxidação de ácidos graxos para a geração de calor. A ativação do TAM é controlada pelo SNS, sendo que um dos sinais é a temperatura abaixo termoneutralidade, o que induz a ativação do SNS e consequentemente a do TAM (LEITNER; BARTNESS, 2009; CINTI, 2009).

A hiperexpressão da proteína UCP1 nos adipócitos marrons promove resistência à obesidade em ratos. Dentro deste contexto, porém contrário a ele, estudos com ratos obesos por razões genéticas mostram que estes animais apresentam redução na termogênese e desenvolvem hiperfagia (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Similarmente, na obesidade induzida por redução de ninhada também há redução na termogênese no TAM. De acordo com os autores, esta reação é promovida pelo reduzido fluxo simpático, pelo menor número de receptores β -adrenérgicos e reduzidas inervações noradrenérgicas o que

provavelmente aumenta a suscetibilidade destes à obesidade (XIAO et al., 2007; HABBOUT et al., 2013).

Devido à capacidade do TAM de gastar energia no processo de termogênese e devido às confirmações da sua presença em seres humanos adultos, existe um interesse no direcionamento do TAM como um tecido anti-obesidade em humanos (SMORLESI et al., 2012). As pesquisas mais recentes sobre o TAM, levantaram a hipótese de que os adipócitos apresentam característica transdiferenciação, ou seja, com determinado estímulo celular podem ser convertidos de TAM em TAB, de TAB em TAM ou ainda de TAB em tecido mamário (CINTI, 2009).

A aclimação em diferentes temperaturas, a gravidez e lactação, obesidade, jejum prolongado e disponibilidade de ingestão calórica são condições mais comuns fisiológicas e patológicas nas quais a natureza plástica do órgão adiposo está envolvida. Há várias evidências, dentre elas a de que durante a exposição à aclimação fria, o fenótipo do adipócito branco muda para marrom (CINTI, 2009). As mudanças foram comprovadas pela histomorfologia das mitocôndrias, das vesículas de lipídeos e pela expressão de UCP-1 comprovada por análise imunohistoquímica. Estes dados sugerem que a maior parte do novo “adipócito bege” surgiu da transformação direta de branco em marrom (SMORLESI et al., 2012). A morfologia dos adipócitos marrons e a expressão da proteína UCP-1 variam em relação aos níveis teciduais de noradrenalina, portanto a presença de receptores β 3-adrenérgicos parecem desempenhar um papel crucial mediando a transdiferenciação dos adipócitos brancos para marrons. Porém os adipócitos marrons constitutivos não possuem a origem na mesma linhagem de célula de desenvolvimento do que os adipócitos brancos (CINTI, 2009).

Na lactação, a função termogênica do TAM diminui, associada à hiperfagia e redução do gasto energético, situação fisiológica para canalizar energias para a produção do leite. Em roedores, a função termogênica do TAM diminui durante a lactação com hipotrofia do tecido, uma diminuição na biogênese mitocondrial e expressão prejudicada do gene da UCP-1. A massa de TAM em humanos pode não alterar muito durante a lactação, mas a lipogênese do TAM está diminuída (PEDRAZA et al., 2000).

2.7 SÍNDROME METABÓLICA

A “síndrome X”, que atualmente é denominada SM foi descrita em 1988 por Reaven, propondo a interrelação entre obesidade, resistência à insulina, hipertensão, DM2 e DCV (REAVEN, 1988; CORNIER et al., 2008). Mais recentemente, a obesidade foi considerada pela OMS (2011) como fator de risco para SM. Estudos epidemiológicos indicam forte associação entre os riscos de desenvolvimento de câncer no sistema digestivo, de diabetes, de DCV e morte precoce em portadores de SM (TIBANA; PRESTES, 2013). No entanto, a população de obesos não é perfeitamente sobreposta com a população com SM, sendo esta um indicador melhor do que a obesidade para prevenir DCV e DM2. Recentemente foi demonstrado que o aumento do tecido adiposo, com consequente secreção exagerada de adipocinas, contribui para o grau de estado pró-inflamatório crônico da SM e a RI. Neste perfil inflamatório da obesidade com SM as adipocinas podem contribuir para aumentar a RI e para promover o aumento do risco de DM2 e DCV (JIALAL, 2013).

Havendo resistência periférica à insulina (incapacidade das células de tecidos periféricos em responder à ação da insulina), podem ocorrer alterações imediatas no metabolismo, tais como: diminuição da captação de glicose; diminuição da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio; aumento da produção hepática de glicose (via aumento da gliconeogênese e glicogenólise) e hiperglicemia. Em consequência, pode haver um aumento da secreção de insulina como um mecanismo compensatório para normalização da glicemia, sem o indivíduo apresentar nenhum sintoma. Apesar de silenciosa, RI é uma condição fisiopatológica com repercussões clínicas e DCV (MUOIO; NEWGARD, 2008).

Um problema comum no processo de diagnóstico da RI é a utilização de apenas dois parâmetros de glicemia: em jejum e pós prandial. Normalmente estes parâmetros podem apresentar-se normais por muitos anos, enquanto o paciente desenvolve a RI. Quando estes exames se alteram o diabetes pode estar em estágio avançado de desenvolvimento com menores possibilidades de reversão da doença. Entretanto, este aumento na secreção de insulina não se mantém a vida toda e a hiperglicemia dá sinais. Em longo prazo ocorre a falência das células β , pela

sobrecarga e a incapacidade das células β em secretar os níveis tão altos de insulina necessários para manter normais os níveis de glicose no sangue. Então a RI evolui para DM2, podendo até, ser verificado menor número de GLUT2 na célula β , consequência da diminuição na expressão destes, resultando em um menor influxo de glicose na célula e menos insulina secretada (CUNHA, 2007; GUILHERME et al., 2008).

Outros fatores desencadeantes da SM na obesidade advêm do excesso de AGL originados pela reação inflamatória e apoptose dos adipócitos hipertrofiados. Os AGL induzem ao estresse do retículo endoplasmático e seus subprodutos interferem na sinalização da insulina nas células, aumentando ainda mais a inflamação do tecido adiposo com piora do quadro, culminando com DM2 (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

No DM2 o indivíduo apresenta resistência à ação da insulina nos tecidos muscular, adiposo e no fígado, acompanhado de menor secreção de insulina. Nos últimos anos, ficou evidente que inúmeros fatores podem regular negativamente a ação da insulina, agindo tanto no IR quanto em moléculas pós-receptor (WHITEHEAD et al., 2000). Assim, fatores produzidos por adipócitos podem promover a ativação de serinas-quinases, especialmente a IKK e a JNK, capazes de fosforilar moléculas da via em resíduos de serina, como IRS-1 e -2, inibindo a sinalização da insulina (PEREIRA, 2009; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

A presença de SM por si só não pode prever o risco de DCV ou DM2. Mas a obesidade abdominal - a manifestação mais comum de SM - é marcada por "TA disfuncional", refletindo a incapacidade relativa de TA para atuar como um reservatório metabólico de proteção para o armazenamento da energia adicional derivada de TG dietéticos, levando à deposição ectópica em depósitos como músculo esquelético, fígado, coração e etc. Assim, a obesidade visceral pode ser, em parte, um marcador de um estado de disfunção metabólica e uma causa da SM (DESPRÉS, 1993; DESPRÉS et al., 2008).

Em um estudo sobre a amamentação para a mãe diabética foi relatado que o colostro das mães diabéticas, apresenta aumento dos níveis de glicose. Além disso, os autores afirmam que as concentrações de insulina no leite materno de mães diabéticas são várias vezes superiores ao considerado normal (CRUME et al., 2011). A insulina pode atravessar a barreira hemato-mucosa intestinal durante o período

neonatal, sendo plausível que os níveis aumentados de glicose e de insulina no leite materno possam aumentar os níveis de glicose e de insulina no sangue da criança (CRUME et al., 2011; NEVILLE et al., 2012). Estas afirmações são complementadas por estudo com ratos, demonstrando que quando uma prole, de fêmea considerada normal, foi amamentada por mãe diabética, apresentou alterações metabólicas. Os filhotes apesar de apresentarem níveis normais de glicose, insulina e leptina ao desmame, apresentaram aumento da expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos orexígenos, tais como o NPY e AgRP, no ARQ, enquanto que a expressão de neuropeptídeos anorexígeno, POMC e α -MSH, foi diminuída. Resultados similares aos desenvolvidos por superalimentação neonatal de redução de ninhada (PLAGEMANN; HARDER, 2005). No entanto, estes autores seguem explicando que as crianças expostas a altas concentrações de glicose e insulina no útero de mães, com diabetes gestacional (DG), já possuem um risco acentuado de apresentarem excesso de peso e RI mais tarde, na vida adulta. Portanto, alertam que tais alterações no colostro de mães DG podem ser responsáveis por acentuar ainda mais as consequências, enquanto sugerem que o leite materno de mulheres não diabéticas pode proteger (PLAGEMANN; HARDER, 2005).

Contrário à opinião descrita acima, estudo sobre a amamentação humana, em mãe diabética durante seis meses ou mais, demonstrou proteger da obesidade na infância e reduzir os níveis de adiposidade associados com a exposição à diabetes no útero, quando comparadas às crianças que não receberam a amamentação das suas mães diabéticas pelos seis meses. Estes dados indicam para as mães que tiveram DG que amamentar seus bebês, ainda é a melhor maneira de reduzir o risco de obesidade infantil ou adulta dos filhos em comparação com o leite formulado (CRUME et al., 2011).

2.8 MODELOS DE OBESIDADE

A obesidade envolve alterações, principalmente nas interações entre pâncreas, fígado, músculo esquelético, tecido adiposo, intestino e cérebro (FRÜHBECK, 2008). Para compreendê-la melhor é necessário o uso de modelos animais de estudo, que são peças fundamentais para toda a ciência biomédica. O uso de animais é necessário para o desenvolvimento de diagnóstico e tratamento de

doenças transmissíveis ou não transmissíveis e para a produção e controle de medicamentos (BUENAÑO ZAMBRANO, 2012). Em obesidade, os mamíferos são os animais que possuem a gênese desta patologia mais próxima à dos humanos, apesar de não existir modelo perfeito devido às particularidades e adaptações na evolução de cada espécie (MCMURRAY; COX, 2011). Dentre os animais mais utilizados estão os ratos e os camundongos pela facilidade do manuseio e ciclo de vida curto (BUENAÑO ZAMBRANO, 2012). Os estudos sobre a obesidade são baseados em protocolos de manipulação (modelos) para a produção de indivíduos obesos, que a partir de alterações genéticas, alimentares, comportamentais, fisiológicas, metabólicas, entre outras, resultam em acúmulo de tecido adiposo (RIBEIRO, 2009). Nos estudos recentes da obesidade está definido que o aleitamento materno é responsável pela sinalização metabólica e tem importante papel na programação do perfil da homeostase energética da prole, bem como no aparecimento de doenças cardiometabólicas neles, na idade adulta (MELNIK; JOHN; SCHMITZ, 2013; OOSTING et al., 2013; POWER; SCHULKIN, 2013; STACHOWIAK et al., 2013). Entretanto, não foram encontrados registros de possíveis adaptações maternas, diante da manipulação só na prole, durante período lactacional, para a indução da obesidade, como no caso dos modelos de obesidade pelo uso do MSG ou de programação metabólica.

2.8.1 Modelo de Programação Metabólica

As primeiras evidências de que alterações nutricionais durante o período gestacional contribuem para a obesidade e SM surgiram do estudo clássico de desnutrição materna, no período da “Fome Holandesa” (1944 a 1945). Recrutas que nasceram nesse período apresentavam um aumento na incidência de obesidade e doenças tais como, DM2 e hipertensão na idade adulta (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976). De acordo com este estudo, a desnutrição materna culminou com baixo peso dos bebês ao nascimento. Este período de restrição nutricional imprimiu nos filhos o “Fenótipo Poupador”, hipótese postulada por Hales e Barker, em 1992. De acordo com estes autores, a programação do metabolismo pode ocorrer no útero e que SM e DM2 são resultados do desafio metabólico pós-natal sem restrição de nutrientes, porém programado para ter perfil poupador (HALES; BARKER, 1992; HALES; BARKER, 2001). Similarmente, a superalimentação peri-natal, também é capaz, de

induzir alterações no circuito neuronal/energético programando o indivíduo para desenvolvimento da obesidade, SM, DM2, alterações cardiovasculares e outras complicações na vida adulta (WATERLAND; GARZA, 1999; LEVIN, 2006; PLAGEMANN et al., 2009; PATEL; SRINIVASAN, 2011; GENTRIC; DESDOUETS; CELTON-MORIZUR, 2012). Estes eventos precoces que programam o metabolismo na vida adulta têm sido chamados de programação metabólica, marcação metabólica ou “metabolic imprinting” (LEVIN, 2006).

A programação metabólica em ratos, pode estar relacionado também ao comportamento. No rato, as variações no cuidado materno parecem influenciar o desenvolvimento de respostas comportamentais e endócrinas ao estresse na prole. Uma manipulação ambiental imposta, durante o desenvolvimento inicial da prole, que altere o comportamento materno, pode afetar o padrão de transmissão comportamental nas gerações subsequentes (PORTHA et al., 2013). Está sendo cada vez mais aceito que os componentes ambientais, incluindo os nutrientes, podem produzir mudanças na atividade do genoma que, apesar de não alterar a sequência de DNA pode produzir alterações importantes, estável e transgeracional no fenótipo. As mudanças epigenéticas, em especial a metilação do DNA e acetilação/metilação de histonas, fornecem uma “memória” de respostas plásticas do desenvolvimento e são fundamentais para a geração de fenótipos e sua estabilidade ao longo da vida. Seus efeitos só podem manifestar-se mais tarde na vida (HANLEY et al., 2010; PORTHA et al., 2013).

Plagemann demonstrou pela primeira vez, em 2009, uma alteração no padrão de metilação do DNA adquirida nutricionalmente e , conseqüentemente, a alteração do “set point” de um gene promotor que é fundamental para a regulação do peso corporal. Sua pesquisa revelou a superalimentação como um fator de risco epigenético da programação de obesidade, SM e conseqüentemente diabetes e DCV. Em sua pesquisa Plagemann relacionou o gene promotor do principal neuro-hormônio anorexígeno POMC, com a programação metabólica (PLAGEMANN et al., 2009).

No entanto, o cérebro não é o único tecido que é sensível às condições perinatais e responsável pela programação perinatal de controle do peso corporal. Dados recentes indicam que o desenvolvimento de outras estruturas,

tais como a inervação periférica do SNS, também podem ser alteradas durante o desenvolvimento e têm um impacto importante na adiposidade e no metabolismo futuro da descendência (PRIEGO et al., 2013).

A redução de ninhada tem sido amplamente utilizada, como modelo de indução de obesidade, pelo benefício do baixo custo. A manipulação do número de filhotes da prole durante o período lactacional modula o volume de produção do leite das mães promovendo efeitos na prole. Este modelo tem como principal característica a hiperfagia dos animais hiperalimentados, promovida também por alterações hipotalâmicas, só que de caráter não lesivo. Deste modo, a redução do número de filhotes da prole causa hiperalimentação lactacional, marcando o metabolismo da prole e predispondo a RI, hiperinsulinemia, dislipidemia e obesidade na vida adulta (HOTAMISLIGIL, 2006). Assim, com este estudo, pretende-se explorar o impacto que a alteração no número de filhotes da prole exerce sobre a morfofisiologia materna, no intuito de compreender melhor os processos metabólicos que interligam mães e filhos.

2.8.2 Modelo Glutamato Monossódico (MSG)

Desenvolvido por Olney em (1969), este modelo tem sido muito utilizado por caracterizar bem a SM com suas alterações neuroendócrinas. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC (LAU; TYMIANSKI, 2010). Quando o MSG é utilizado, em tratamento neonatal em altas doses, causa no SNC destruição neurotóxica das células do ARQ do hipotálamo. A quantidade de MSG a ser utilizada foi calculada para ser suficientemente alta para induzir a obesidade em adultos, mas baixa o suficiente para evitar a destruição extensa do SNC (OLNEY, 1969; BUENO et al., 2005). Os principais motivos da geração da obesidade por lesão no ARQ, estão associados ao desarranjo autonômico com redução do gasto energético, que levam à hipercolesterolemia e hiperinsulinemia (LEITNER; BARTNESS, 2009; MIRANDA et al., 2013).

A obesidade na idade adulta de ratos tratados com MSG se desenvolve sem hiperfagia no pós-natal, mas com reduzido gasto de energia, com aumento nos depósitos de TAB. Consequentemente, apresentam hiperinsulinemia e demais características da SM, porém sem desenvolver DM2 no início da idade adulta (60

dias) (TOLEDO-RODRIGUEZ; SANDI, 2011). Camundongos e hamsters siberianos adultos, tratados neonatalmente com MSG mostram capacidade termogênica reduzida no TAM, com uma resposta à exposição aguda ao frio prejudicada (SCHOELCH et al., 2002; LEITNER; BARTNESS, 2009).

Este modelo de obesidade por lesão hipotalâmica neonatal se mostrou bem adequado para compor o presente trabalho por permitir a manipulação da prole, em período lactacional, sem manipulação a ingesta alimentar e hídrica da progenitora. Por outro lado se apresenta ainda mais representativo por não ter sido encontrado dados sobre o impacto da lactação da prole sobre as mães, mesmo sendo um modelo estudado desde o século passado, na década de 60.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as adaptações morfofisiológicas maternas promovidas pela obesidade da prole induzida no período lactacional.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desenvolvimento de obesidade na prole, submetida a manipulação química e/ou de redução de ninhada;
- Avaliar os efeitos da manipulação das proles sobre o consumo de água, ração e no peso corporal das mães;
- Investigar o perfil bioquímico do sangue materno com relação ao metabolismo glicêmico e lipídico;
- Estudar a composição do leite materno diante da manipulação das proles;
- Quantificar alterações nos depósitos de tecido adiposo branco e marrom das mães decorrentes de manipulações da prole;
- Analisar a morfologia das glândulas mamárias e pancreáticas maternas frente a manipulações da prole.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas fêmeas nulíparas de ratos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), integrantes de três projetos de pesquisa, conforme Cartas de Aprovação do Protocolo nº 03482/2012 processos 16/2012, 17/2012 e 18/2012 da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG da Diretoria de Pesquisa desta Instituição, constante no Anexo 9.1.

As ratas foram acasaladas na proporção de três fêmeas para cada macho, mantidas em caixas (dimensões 60 x 50 x 22 cm). Receberam tanto ração quanto água *ad libitum*, sendo que a ração comercial fornecida foi da marca Nuvital Nutrientes Ltda e foi utilizada água do abastecimento público.

Durante todo o experimento, as condições de luminosidade foram controladas, com 12/12 horas de ciclo intercalado de claro e escuro (07 às 19 horas) e a temperatura média ambiente mantida em $21^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os consumos de água e ração, peso das mães e das ninhadas foram anotados diariamente durante os 21 dias de lactação. Os grupos foram organizados conforme descrito a seguir e representado na Figura 8. Por existir, dentre outras diferenças, a do número de filhote entre os protocolos de produção de obesidade é que neste estudo incluímos um grupo controle para cada modelo.

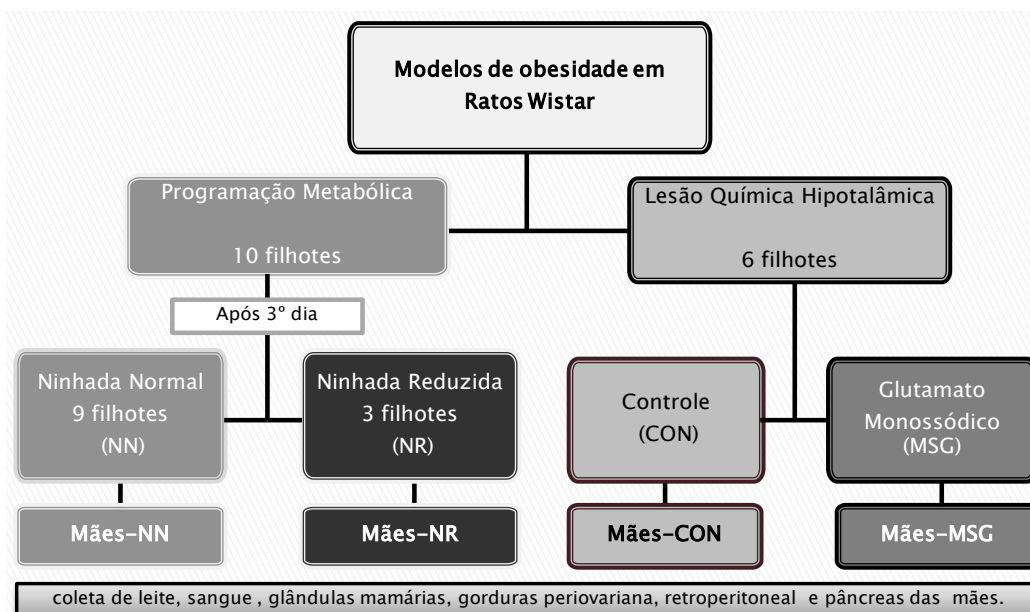


Figura 8 - Representação esquemática do fluxograma da composição dos grupos

Modelo (1) Programação Metabólica:

Neste grupo todas as mães tiveram suas ninhadas ajustadas para 10 filhotes no 1º dia do nascimento. Somente no 3º dia após o nascimento as ninhadas foram rearranjadas em 2 grupos, para o período de lactação restante:

- Mães-Ninhada Normal (NN), com 9 filhotes por mãe, n= 8 mães;
- Mães-Ninhada Reduzida (NR), com 3 filhotes por mãe, n=17 mães.

De acordo com a afirmativa de Plagemann et al (1999), até o 3º dia de lactação a produção de leite pode ser ajustada de acordo com o número de filhotes da prole. Portanto, ao reduzir a ninhada após este período é garantido maior aporte de leite à ninhada reduzida, consequentemente estes filhotes estarão expostos a uma hipernutrição lactacional que favorece a obesidade e o ganho de peso na vida adulta.

Modelo (2) Lesão hipotalâmica por Glutamato Monossódico (MSG):

Neste modelo, as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes no 1º dia de nascimento. No 2º dia, os filhotes foram expostos à administração subcutânea de 2 diferentes tratamentos, conforme descrito abaixo. O mesmo número de filhotes foi mantido durante todo o período lactacional.

- Mães-MSG - Grupo MSG em que os filhotes receberam a aplicação intradérmica de glutamato monossódico, MSG (4g/Kg) nos cinco primeiros dias de vida, n= 6 mães;
- Mães-CON – Grupo Controle (CON) em que os filhotes receberam a aplicação intradérmica de salina equimolar nos cinco primeiros dias de vida, n= 6 mães.

O tratamento neonatal com MSG é um modelo de lesão hipotalâmica que pela ação neurotóxica causada pela aplicação de altas doses de glutamato monossódico, ainda em período de desenvolvimento do SNC, promove desarranjos neuroendócrinos culminando com obesidade na vida adulta (OLNEY, 1969).

4.2 ORDENHA DO LEITE

As lactantes, sempre pela manhã do dia do desmame, foram separadas dos filhotes com 4 horas de antecedência da ordenha, para obter acúmulo de leite nas glândulas mamárias. As mães foram mantidas em jejum conforme protocolo padronizado por LEITE et al. (2007). Posteriormente, as mães foram anestesiadas intramuscularmente com a mistura v:v de xilasina (0,2 mg/g) e quetamina (0,5 mg/g). Seguindo a anestesia foi aplicada ocitocina sintética da marca Vernil formulada com 10 unidades internacionais por mililitro (10 UI/mL), administrada uma dose intraperitoneal de 5UI/kg de peso da rata, para estimular a ejeção do leite. Finalmente foi iniciada a ordenha manual para coleta de aproximadamente 500µL de leite por lactante. As amostras de leite foram coletadas em microtubos estéreis e imediatamente congeladas a -20° C, para posteriores.

4.3 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS NO LEITE

Uma amostra do leite coletado de cada uma das mães foi utilizada para a realização do leucograma (contagem global dos leucócitos no leite) pelo método de distensão celular (esfregaço). Neste procedimento, 50µL de leite foram homogeneizados por cinco minutos em homogeneizador automático e em seguida a alíquota transferida sobre lâmina de vidro. Foi realizada a distensão da gota com o auxílio de outra lâmina deslizando em ângulo de 40° sobre a gota de leite.

Posteriormente seguiu-se a fixação seca por ser mais recomendada em distensão de células sanguíneas e utilizado o sistema para coloração hematológica de May-Grünwald – da marca Bioclin conforme recomendação do fabricante QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda de Belo Horizonte MG – Brasil. Para esta etapa, as lâminas contendo o esfregaço foram cobertas com 20 gotas do corante-1 May-Grünwald, mantidas durante três minutos. Foram adicionadas 20 gotas de água destilada, por um minuto. As soluções foram então escorridas, sem lavar e foram adicionado 20 gotas da preparação-2 Giemsa, deixado agir por 15 minutos. Por fim, foram lavadas as lâminas com água corrente. Depois de seco, puderam ser observadas ao microscópio com objetiva de imersão. Para as análises foi determinado o número total de leucócitos, conforme pesquisa de leucócitos em fluidos corpóreos e hemograma por campo, em 10 campos por lâmina, sendo uma lâmina para cada mãe (MOLINARO, 2010). As lâminas foram analisadas por profissional Farmacêutico/Bioquímico do Laboratório Escola da UEPG, sob a microscopia óptica com Olympus BX 40, mediante aumento de 1000X (objetiva de imersão), n= 6 a 8 mães por grupo. O resultado foi expresso pela média $\pm$ erro padrão da média (epm).

4.4 CREMATÓCRITO DO LEITE

A partir do leite ordenhado de cada rata, foi realizado o crematócrito, que é a técnica analítica que permite a estimativa do conteúdo energético do leite (LUCAS et al., 1978; COLLARES; GONÇALVES; FERREIRA, 1997). Para cada amostra de leite, três alíquotas de 75 μ L foram coletadas em tubos microcapilares (75 mm x 1 mm x 1,5 mm), nos quais uma das extremidades foi vedada com auxílio de aquecimento com o bico de Bunsen. Posteriormente, os tubos foram dispostos em microcentrífuga com as extremidades vedadas na direção centrífuga (para fora) e submetidos à centrifugação por 15 minutos, em 3500 rotações por minuto (rpm). Após centrifugação, duas colunas são observadas, a coluna de creme e a coluna de soro. Ambas são medidas com auxílio de régua e os dados expressos em milímetros (mm). Os cálculos foram realizados, a partir das medidas das colunas, estimando o valor calórico e porcentagem de gordura do leite das progenitoras e comparando-os com seus controles, baseados em uma equação de regressão, usando fatores de

conversão de kcal/g de lipídeos, carboidratos e proteínas (WANG et al., 1999). Conforme o protocolo do manual do Banco de Leite: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos (BRASIL; ANVISA, 2008) descrito a seguir.

- Avaliação do teor de creme: $\text{Coluna de creme (mm)} \times 100 \div \text{coluna total (mm)} = \% \text{ de creme.}$
- Avaliação do teor de gordura: $(\% \text{ de creme} - 0,59) \div 1,46 = \% \text{ de gordura.}$
- Cálculo do conteúdo energético total: $(\% \text{ de creme} \times 66,8 + 290) = \text{kcal/litro.}$

Obs.: Coluna total = coluna de creme + coluna de soro

Coluna de creme = componentes lipossolúveis + conteúdo proteico.

4.5 DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS NO LEITE

A determinação das proteínas totais no leite foi realizada pelo método de Bradford, em duplicata. Esta técnica para a determinação de proteínas totais utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue”. A leitura foi feita em espectrofotômetro em 595 nm de comprimento de onda, em leitora de microplaca de absorbância da marca Biotek® modelo ELx 800 (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998). As amostras foram diluídas 1:20, em água destilada. Para determinar o teor proteico a leitura de cada amostra foi comparada com curva padrão de solução de albumina (0,5 mg/mL a 5,0 mg/mL). Os resultados foram convertidos de mg/mL para µg/µL.

4.6 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO

Foi avaliado diariamente, o peso corporal das mães e das ninhadas, bem como o consumo alimentar e hídrico das mães, com base na subtração entre a ração e água ofertadas e a sobra diária. Os dados foram expressos como g/100g de peso corporal.

4.7 AVALIAÇÃO DA GORDURA

Todas as progenitoras foram eutanasiadas por decapitação ao término da experiência, enquanto estavam mantidas pela anestesia. Logo após, foram retirados os depósitos de gordura periovariana e retroperitoneal. Ambos foram pesados e os dados expressos em g/100g de peso corporal. Adicionalmente, uma amostra de tecido adiposo de ambos os depósitos foi separada e submetida a técnicas histológicas, conforme procedimento descrito a seguir.

4.8 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Após os procedimentos anteriores, no momento da decapitação o sangue total foi coletado em tubos heparinizados, sendo em seguida centrifugados em 3000 rpm por 15 minutos para a separação do plasma. O plasma foi armazenado em microtubos, congelado à -20°C para uso posterior. Os plasmas foram submetidos às análises de glicose e triglicérides, por método enzimático, usando “kit” comercial Gold Analisa®, conforme instrução do fabricante. A leitura da absorbância em duplicata foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados foram expressos em mg/dL. A insulina foi determinada pela técnica de Radioimunoensaio (RIE).

4.9 HISTOLOGIA

Para análises histológicas foram retirados os seguintes tecidos maternos: os depósitos do TAB (retroperitoneal e periovariano), TAM, GM e pâncreas. Para representar a GM, foi eleita a mama inguinal inferior direita das mães. Para o pâncreas, foi padronizada a retirada de aproximadamente 2 cm² da porção caudal do pâncreas por se tratar da porção mais ativa deste. Quanto ao TAM foi retirado todo depósito inter-escapular. Todas as amostras de tecidos retirados foram imediatamente fixadas em alfac (álcool 80%; formol 40%; ácido acético glacial; na razão de 85:10:5 respectivamente) por 14 a 18 horas. Para obtenção dos cortes histológicos dos tecidos foi seguido protocolo de rotina conforme dados da Tabela 2.

Tabela 2 – Protocolo de histologia para inclusão em parafina.

Etapas	Procedimento	Reagente	Tempo
1	Desidratação	Álcool 70 %	1 h
2	Desidratação	Álcool 80 %	1 h
3	Desidratação	Álcool 90 %	1 h
4	Desidratação	Álcool Absoluto I	1 h
5	Desidratação	Álcool Absoluto II	1 h
6	Clarificação	Xilol I	30 min.
7	Clarificação	Xilol II	30 min.
8	Impregnação	Parafina I	30 min.
9	Impregnação	Parafina II	30 min.
10	Inclusão	Parafina	Indeterminado

Fonte: Laboratório de Histologia da UEPG.

Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo manual da marca Leica®, modelo RM2125. Os cortes foram obtidos com 5 µm de espessura. Foi utilizada a albumina em glicerina como adesivo nas lâminas. Para evitar análise das mesmas estruturas celulares, os cortes seguiram um padrão semi-seriado. A cada lâmina obtida, foram descartados 10 cortes de 20 µm cada. A distância entre os cortes foi de 200 µm aproximadamente. Produzindo 3 lâminas para cada órgão. Todos os cortes foram posteriormente corados em hematoxilina-eosina (H&E), fotografados e analisados sob o microscópio de luz com sistema óptico, Olympus BX41 com captura digital de imagem com o Software DP71 Controller. Foi fotografado um campo aleatório de cada uma das três lâminas, de cada órgão, de cada mãe (n=4-5), em geral 12 fotos de cada tecido, para cada grupo, para a avaliação estatística das imagens pelo *software* Image J. Para a obtenção da média da área dos adipócitos e número destes por campo, da região periovariana e retroperitoneal as fotos foram capturadas em aumento de 200 vezes (200X). Para a avaliação do número de adipócitos na GM e a avaliação do número e tamanho das ilhotas pancreáticas foi utilizado o aumento de 40x. A variação no número de lâminas em cada grupo é decorrente das perdas de tecido durante a coloração das lâminas.

4.10 PROLE

Para a confirmação da obtenção de prole obesa, os filhotes foram mantidos até os 90 dias de vida, em caixas dimensões 60 x 50 x 22 cm com cinco animais por caixa. Receberam tanto ração quanto água *ad libitum*. Durante este período, as condições de luminosidade foram mantidas, com 12/12 horas de ciclo intercalado de claro e escuro (07 às 19 horas) e a temperatura média ambiente mantida em $21^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Eles foram decapitados aos 90 dias, sendo retirado e pesado o depósito de gordura retroperitoneal para obter informação sobre a adiposidade da prole. Apenas os filhotes machos participaram da pesquisa, para descartar variações decorrentes das oscilações estrais às quais as fêmeas são sujeitas.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e estatisticamente avaliados pelo teste t de Student, com $p < 0,05$ adotado como critério de significância. O software GraphPad Prism[®] versão 5.0 foi utilizado para análise de dados e elaboração de gráficos. Os resultados obtidos sobre os grupos foram comparados: Mães-NN *versus* Mães-NR e Mães-MSG *versus* Mães-CON.

5 RESULTADOS

5.1 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO

Os efeitos da manipulação da prole sobre o consumo alimentar e hídrico das mães durante o período lactacional estão representados na Figura 9 (**A**, **B**, **D** e **E**) com as respectivas áreas sob a curva (ASC). Durante este período, as Mães-NR apresentaram menor consumo alimentar e hídrico. Deste modo, a análise da ASC das Mães-NR apresenta redução de 37,4 % e 36,2% respectivamente, no consumo alimentar (**A**) e hídrico (**B**), quando comparadas as Mães-NN ($p<0,05$). Por outro lado, as Mães-MSG apresentaram uma queda de 10,3% na ASC do consumo alimentar (**C**) em relação às Mães-CON sem, entretanto, afetar o consumo hídrico (**D**). Durante o período de 21 dias de lactação não foram verificadas alterações significativas nos pesos das Mães-NR em relação às Mães-NN conforme Figura 9 (**E**). Todavia, foram verificado 10% de aumento nos pesos das Mães-MSG em relação às Mães-CON, conforme representado em (**F**).

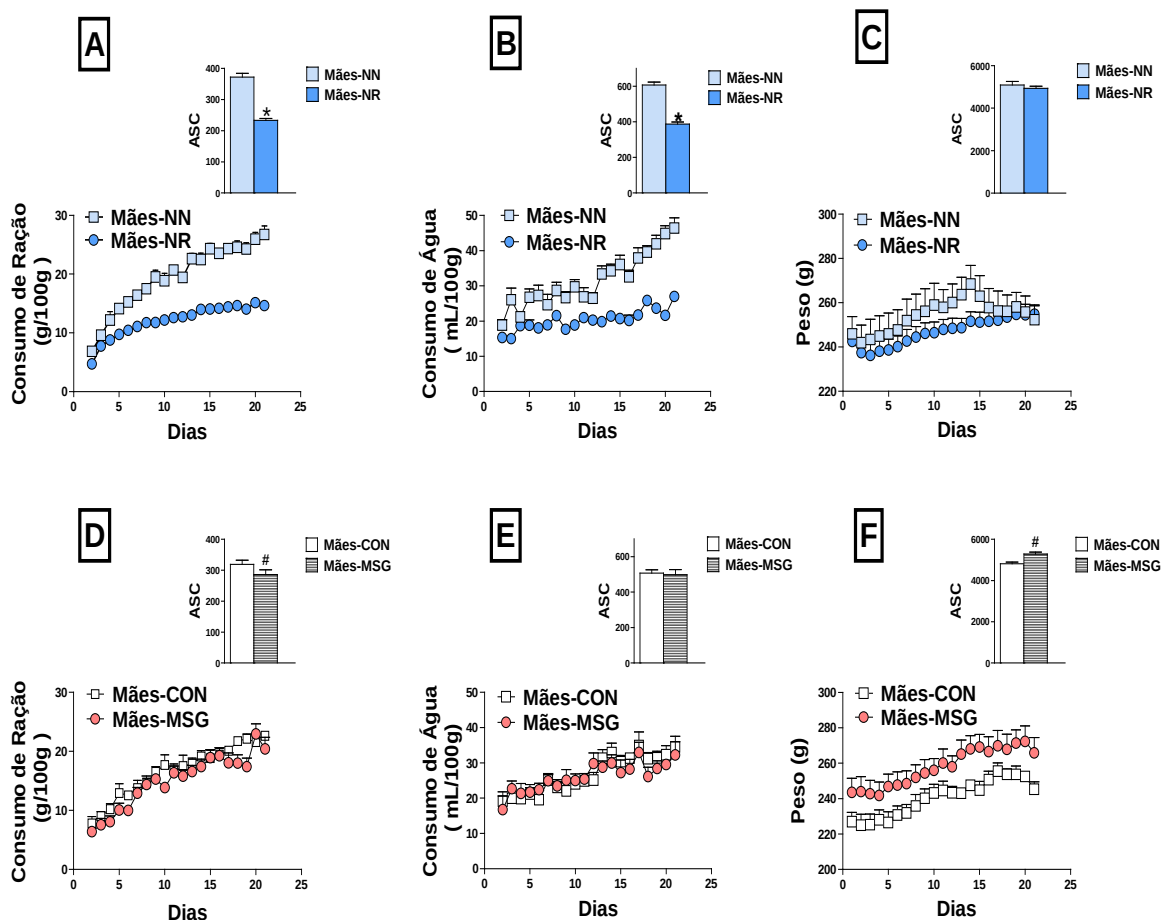


Figura 9 – Efeito da manipulação da prole sobre o consumo de ração, de água e peso das mães durante a lactação. Cada ponto nos gráficos de linha representa a média $\pm$ epm; Mães-NN n=8; Mães-NR n=17; Mães-CON e MSG n=6. A respectiva análise da ASC está no inserte acima de cada gráfico. O consumo alimentar está representado nos gráficos **A** e **D**, o consumo de água está representado nos gráficos **B** e **E**, enquanto o peso está representado nos gráficos **C** e **F**. Os símbolos sobre as barras representam diferenças estatísticas de $p < 0,05$ no teste t de Student. *Mães-NN versus Mães-NR; #Mães-CON versus Mães-MSG.

5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

O perfil bioquímico plasmático das mães está representado na Tabela 3. Conforme os resultados obtidos, no modelo de programação metabólica as Mães-NR apresentaram aumento de 33,4%; 46,7% e 43,7% respectivamente, nos valores glicêmicos, insulinêmicos e de triglicerídeos em relação às Mães-NN ($p < 0,05$). No modelo de lesão química, os aumentos foram mais significativos, observa-se que as Mães-MSG apresentaram aumentos de 35,1%; 69,3% e 73,1% respectivamente na glicemia, insulinemia e triglicerídeos comparados as Mães-CON ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos do plasma das mães aos 21 dias de lactação.

	Mães-NN	Mães-NR	Mães-CON	Mães-MSG
Glicose (mg/dL)	156,8 ± 5,8	209,2 ± 18,6 *	148,3 ± 2,4	200,0 ± 20,5 #
Insulina (ng/mL)	0,554 ± 0,175	0,813 ± 0,259*	0,326 ± 0,072	0,553 ± 0,097 #
Triglicerídeos (mg/dL)	95,6 ± 7,0	137,4 ± 10,4*	92,8 ± 11,2	160,6 ± 25,1 #

Os dados representam a média ± epm; Mães-NN n=8; Mães-NR n=17; Mães-CON e MSG n=6. Os símbolos acima dos números representam diferenças significativas de $p < 0,05$ no teste t de Student.

*Mães-NN versus Mães-NR; #Mães-CON versus Mães-MSG.

5.3 COMPOSIÇÃO DO LEITE

O estudo também avaliou o impacto da manipulação da prole na composição e na quantidade de leucócitos, conforme demonstram os dados da Tabela 4. O leite de Mães-NR apresentou aumento de 32,2% no teor de calorias, acompanhado do aumento de 44% na quantidade de gordura, quando comparado ao leite de Mães-NN ($p < 0,05$). Todavia, o conteúdo de proteínas e o número de leucócitos no leite de Mães-NR foram similares ao leite de Mães-NN. O leite de Mães-MSG apresentou aumento de 53,7% no número de leucócitos em relação ao leite de Mães-CON ($p < 0,05$). Neste grupo os demais parâmetros não foram alterados significativamente.

Tabela 4 – Composição do leite das mães no 21º dia de lactação.

	Mães-NN	Mães-NR	Mães-CON	Mães-MSG
Calorias (kcal/mL)	130,3 ± 10,7	172,3 ± 11,2 *	148,3 ± 9,7	143,7 ± 9,4
Gordura (%)	9,9 ± 1,1	14,3 ± 1,1*	11,8 ± 1,0	11,3 ± 0,9
Proteínas (µg/µL)	69,8 ± 3,7	73,8 ± 6,3	73,3 ± 4,1	71,9 ± 2,6
Leucócitos (10 campos/1000X)	26,0 ± 2,2	22,8 ± 1,2	29,8 ± 3,6	45,8 ± 1,8 #

Os dados representam a média ± epm; Mães-NN n=8; Mães-NR n=17; Mães-CON e MSG n=6. Os símbolos acima dos números representam diferenças significativas de $p < 0,05$ no teste t de Student.

*Mães-NN versus Mães-NR; #Mães-CON versus Mães-MSG.

5.4 HISTOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA - GM

O estudo revelou o impacto da manipulação da prole durante a lactação sobre a morfologia da GM, conforme mostram os dados da Figura 10. A contagem de adipócitos das GM constante nos gráficos **A** e **B** da Figura 10 revelou aumento na porcentagem de gordura para Mães-NR de 1215% e de 41,4% para as Mães-MSG em relação aos seus controles no último dia de lactação, baseado no número de adipócitos por campo.

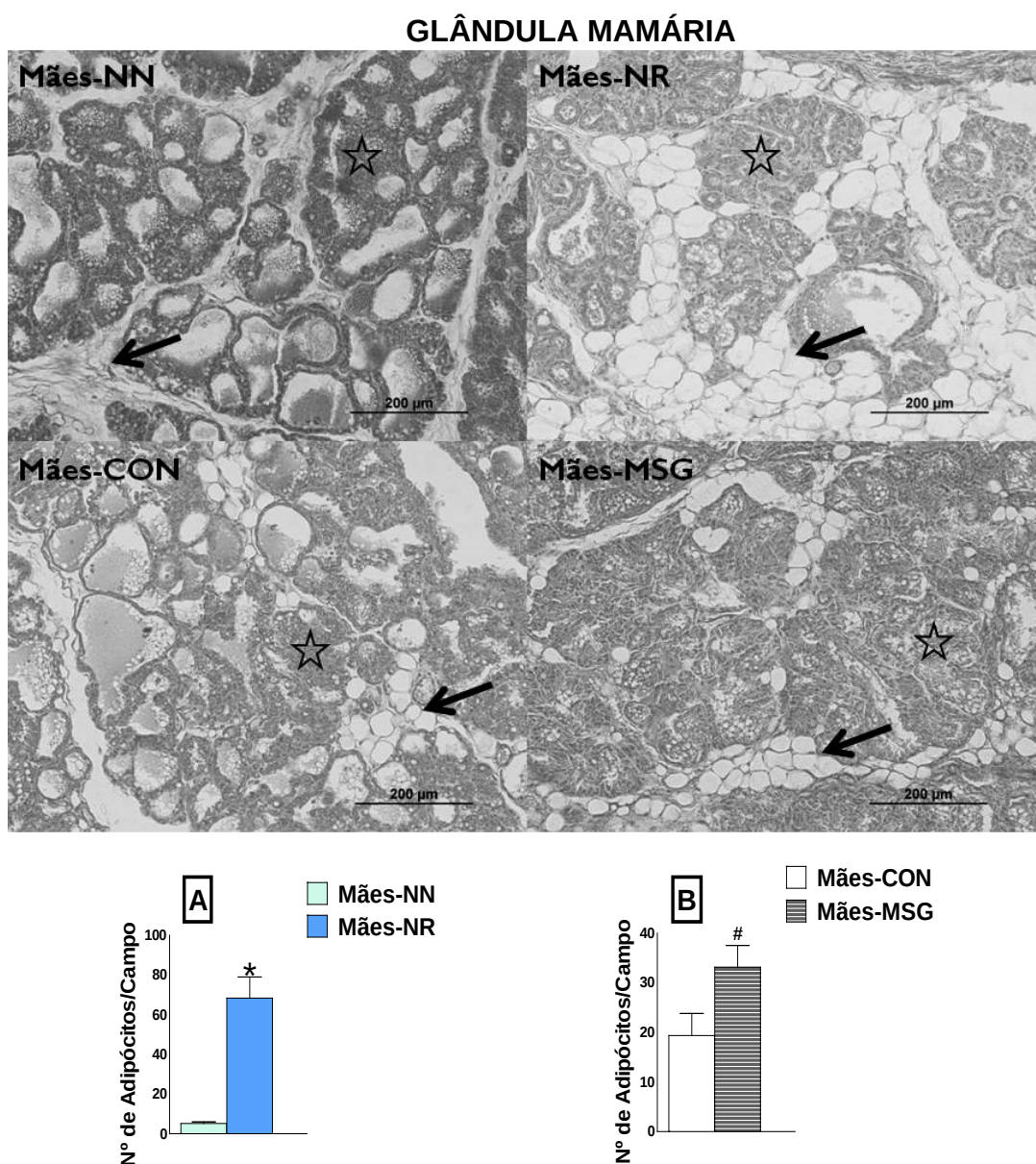


Figura 10 – Efeito da manipulação da prole durante o período lactacional sobre a histomorfologia das glândulas mamárias: As estrelas nas fotos indicam os alvéolos mamários e as setas indicam o tecido conjuntivo, com ou sem tecido adiposo visível. O tecido foi corado com H&E, aumento de 200X. Nos gráficos os valores representam a média $\pm$ epm; n=12 lâminas por grupo. Os símbolos sobre as barras representam diferenças estatísticas de $p < 0,05$ no teste t de Student. *Mães-NN versus Mães-NR; #Mães-CON versus Mães-MSG.

5.5 HISTOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO – TAB

5.5.1 Gordura Periovariana

Os depósitos de gordura periovariana foram avaliados pela medida do peso, pela análise histológica da área média dos adipócitos e determinação do número de adipócitos por campo, conforme demonstram os dados da Figura 11. A massa de gordura periovariana aumentou 55,9% e 40,1%, respectivamente, nas Mães-NR e Mães-MSG (Figura 11 **A** e **B**) em relação ao mesmo depósito nos respectivos grupos controles ($p<0,05$). Todavia, na análise histológica deste depósito no grupo de Mães-MSG não houve alteração no tamanho (Figura 11 **D**) ou no número médio de adipócitos por campo, conforme mostra na Figura 11 **F**, comparada ao seu grupo controle. Por outro lado, o depósito periovariano das Mães-NR apresentou redução de 19% do número de adipócitos por campo, como consta na Figura 11 **E**, apresentando também um aumento de cerca de 30%, na área média dos adipócitos quando comparados às Mães-NN, conforme a Figura 11 **C** ($p<0,05$).

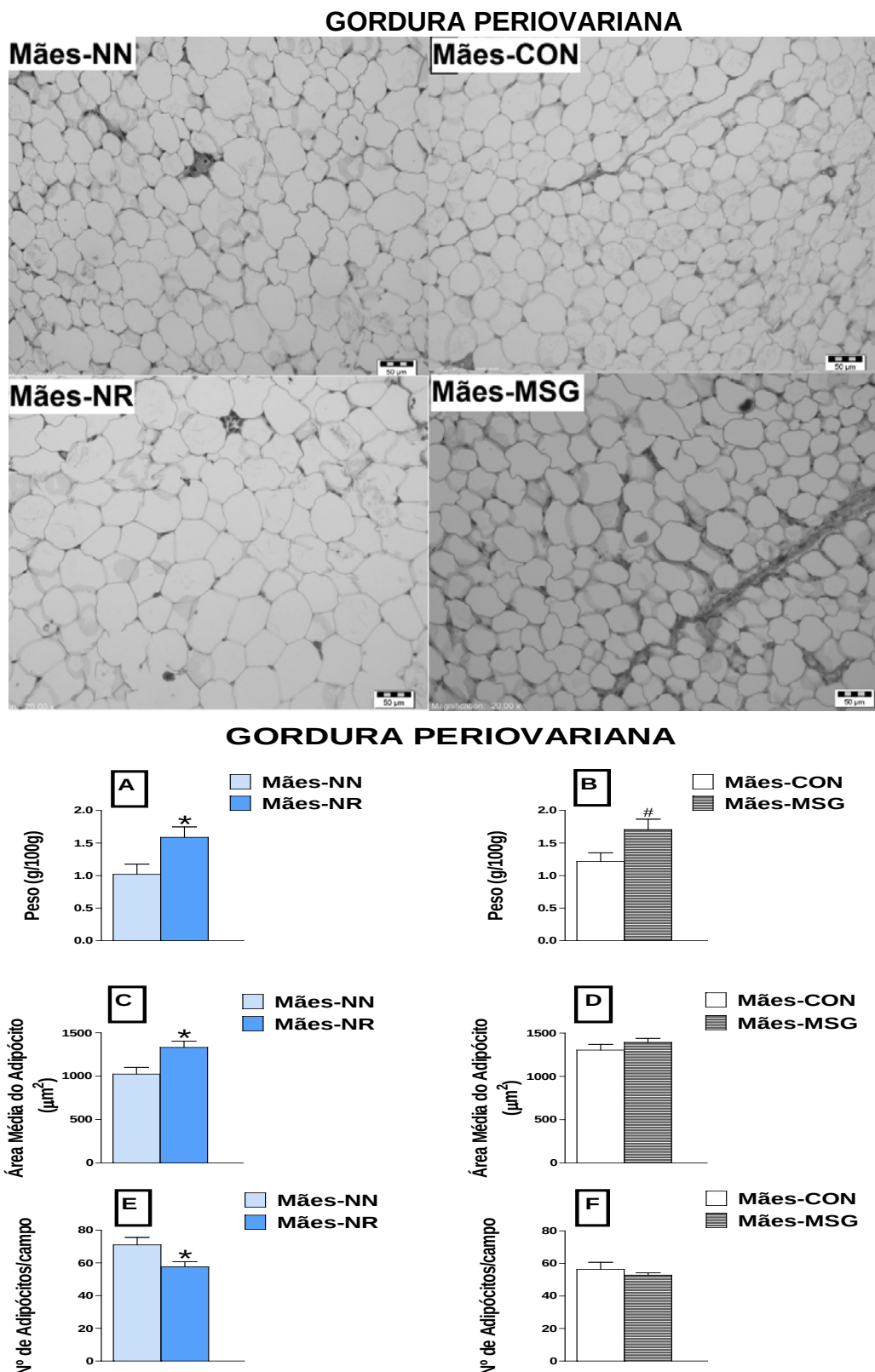


Figura 11 – Efeitos da manipulação da prole no conteúdo e morfologia da Gordura Periovariana das Mães. Nos gráficos **A** e **B** os valores representam a média $\pm$ epm; $n=6-17$ ratas, do peso da gordura periovariana (g/100 g do peso corpóreo). Os gráficos **C**, **D**, **E** e **F** representam área média (μm^2) e o número de adipócitos por campo; $n=10-12$ lâminas por grupo, em aumento de 200X. Os símbolos sobre as barras representam diferenças estatísticas de $p<0,05$ no teste t de Student. *Mães-NN versus Mães-NR; #Mães-CON versus Mães-MSG. As fotos digitalizadas representam o tecido adiposo periovariano, em aumento de 200X, corado com H&E.

5.5.2 Gordura Retroperitoneal

Conforme demonstra a Figura 12, o peso (g/100 g de peso corpóreo) das gorduras retroperitoneais (**A** e **B**) das Mães-NR e Mães-MSG aumentou 85,7% e 59%, respectivamente, comparado ao mesmo depósito nos grupos controles ($p<0,05$). Em ambos os grupos o aumento da massa foi acompanhado pelo aumento na área média (em μm^2) dos adipócitos, de 67,4% (Mães-NR) Figura 12 **C** e 22,6% (Mães-MSG) Figura 12 **D**, em relação aos respectivos grupos controles. Conforme os dados da Figura 12, o número de adipócitos por campo no grupo de Mães-NR apresentou redução de 32% (**E**) e nas Mães-MSG a redução foi de 14% (**F**), em relação aos controles.

GORDURA RETROPERITONEAL

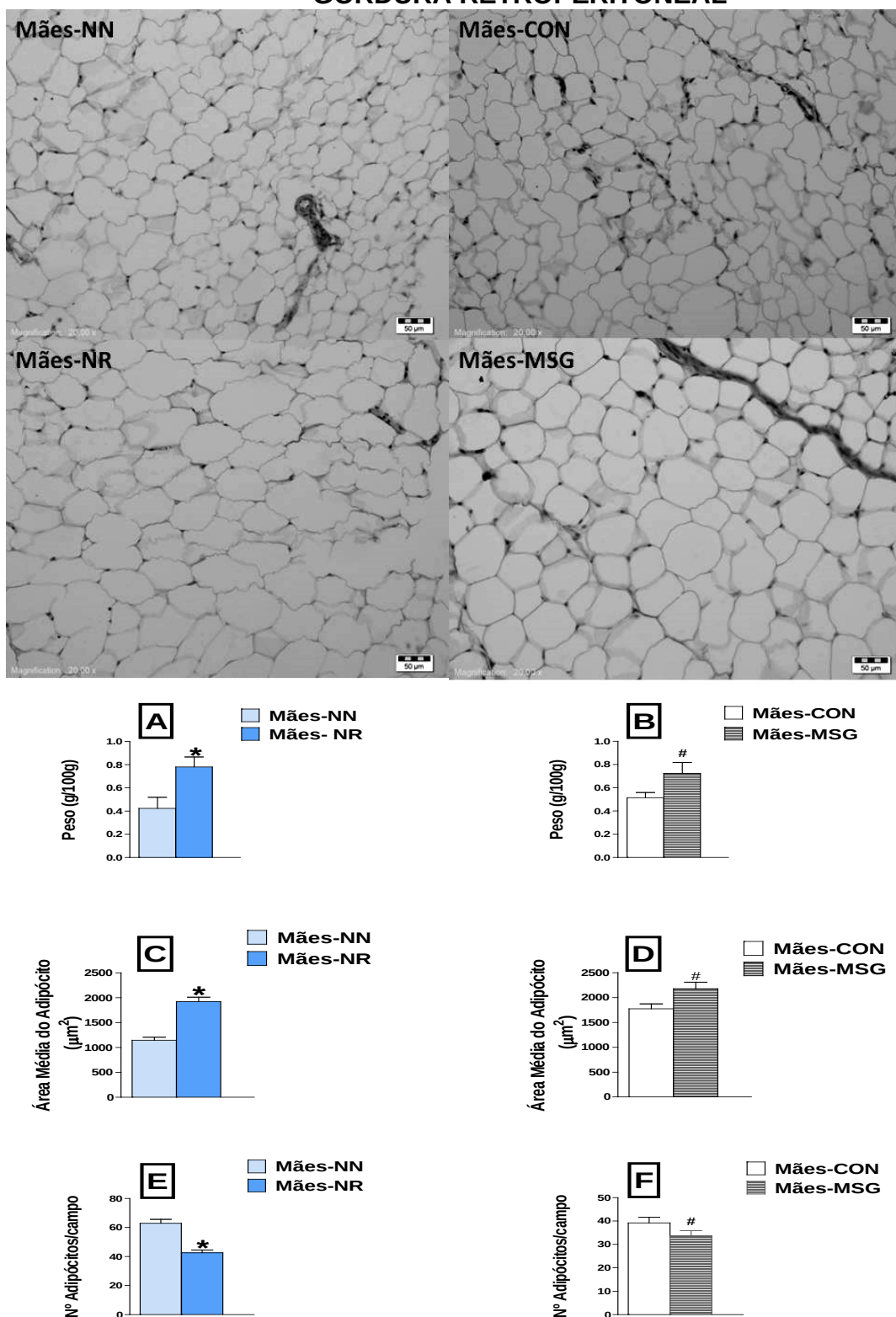


Figura 12 – A morfologia da gordura retroperitoneal das mães, sob o efeito da manipulação na prole. As fotos representam o tecido adiposo retroperitoneal, aumento de 200X, corado com H&E. Abaixo das fotos seguem os gráficos **A** e **B** - peso das gorduras das Mães-NN e NR, e Mães- CON e MSG respectivamente, representadas em g/100g do peso corporal, n=6-17 ratas. Os gráficos **C**, **D**, **E** e **F** representam área média (μm²) e o número de adipócitos por campo, os valores representam a média ± epm; n=10-12 lâminas por grupo. Os símbolos sobre as barras representam diferenças estatísticas de p<0,05 no teste t de Student. *Mães-NN versus Mães-NR; #Mães-CON versus Mães-MSG.

5.6 HISTOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO MARROM - TAM

A manipulação na prole produziu alteração no depósito interescapular de gordura do TAM das Mães-NR, com aumento de 28% ($p<0,05$) no número de adipócitos por campo (Figura 13 A). Qualitativamente, também podemos observar que os adipócitos do TAM de Mães-NR, apresentam menor teor das gotículas de gordura em seu citoplasma comparado aos de Mães-NN. Entretanto, o TAM das Mães-MSG não apresentou alterações em relação ao controle (Figura 13 B).

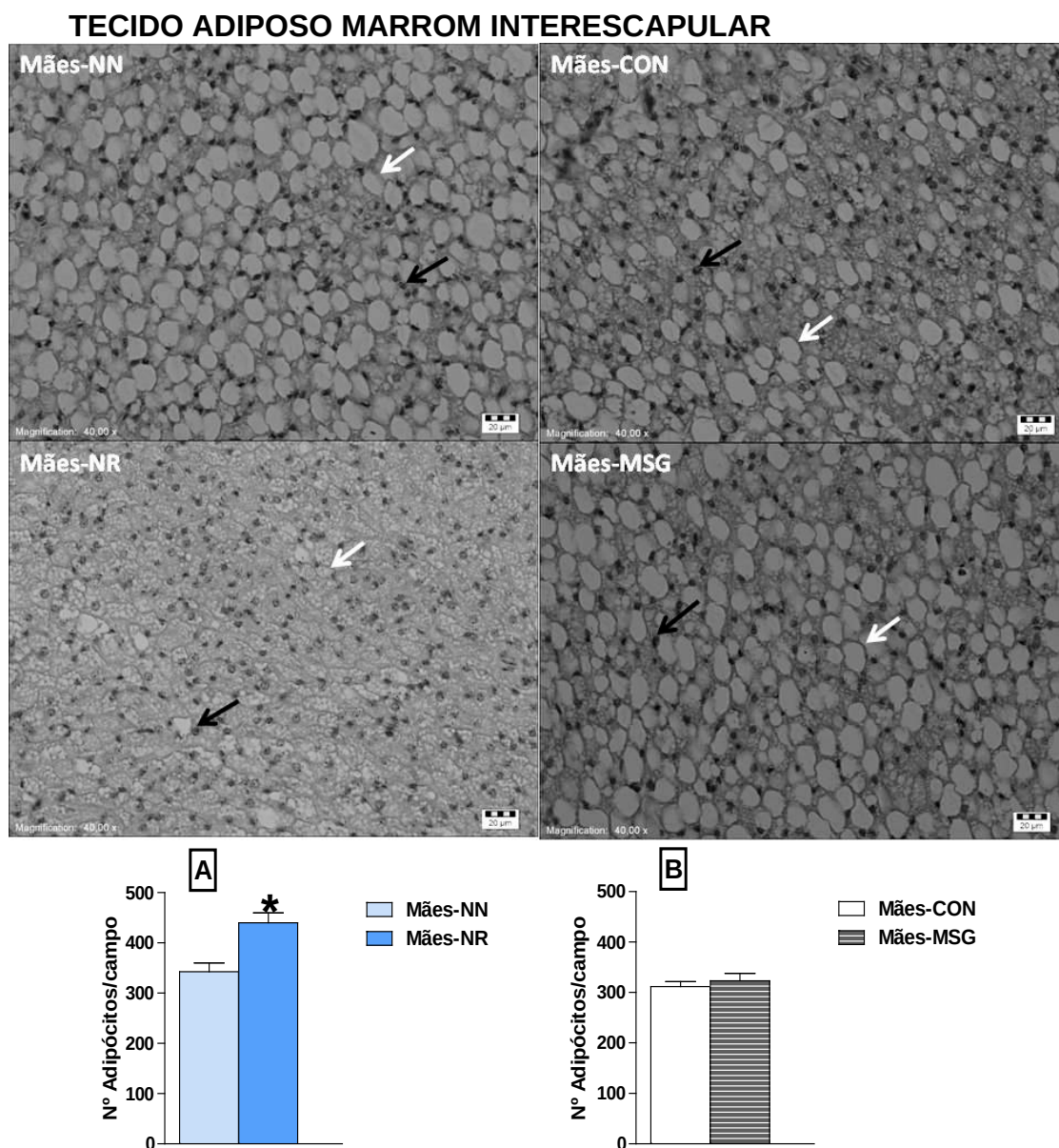


Figura 13 – Avaliação da manipulação da prole durante a lactação sobre o tecido adiposo marrom interescapular em Mães. O tecido foi corado com H&E, aumento de 400X. Gráfico do TAM, número de adipócitos/campo. **A** - Mães-NN e NR; **B** – Mães-CON e MSG. Os valores representam a média $\pm$ epm; $n=12$ lâminas por grupo. Os símbolos sobre a barra representa diferença estatística de $p<0,05$ no teste t de Student. *Mães-NN versus Mães-NR; A seta branca aponta para uma gotícula de gordura e a seta preta aponta para o núcleo de adipócito marrom.

5.7 HISTOLOGIA DO PÂNCREAS

Nosso estudo também demonstrou que a manipulação da prole durante a lactação altera a morfologia do pâncreas endócrino, conforme dados da Figura 14. As Mães-NR apresentaram redução do tamanho das ilhotas de 23,6% em relação às Mães-NN e as Mães-MSG apresentaram aumento do tamanho das ilhotas de 69,8% em relação às Mães-CON, alterações são confirmadas pela histomorfometria representada na Figura 14 (**A** e **B**). Sendo que as Mães-MSG apresentam também aumento de 35,9% no número de ilhotas por campo (**D**) em relação ao seu controle. Não houve alteração no número de ilhotas por campo nas Mães-NR (**C**) em relação ao controle NN.

PÂNCREAS

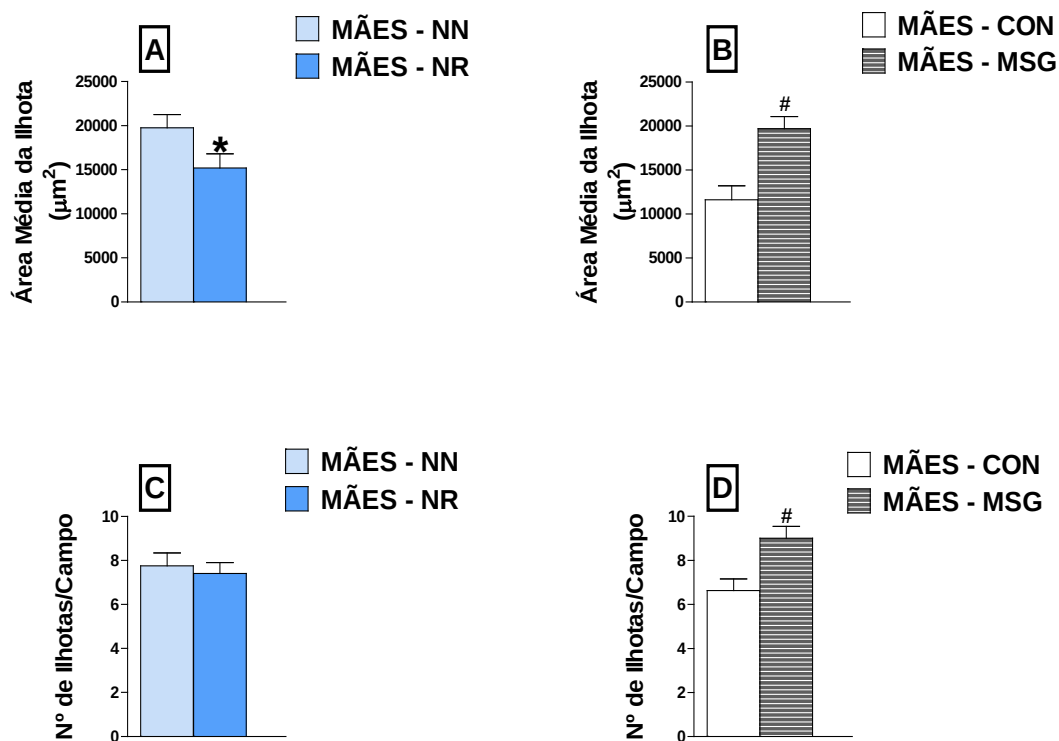
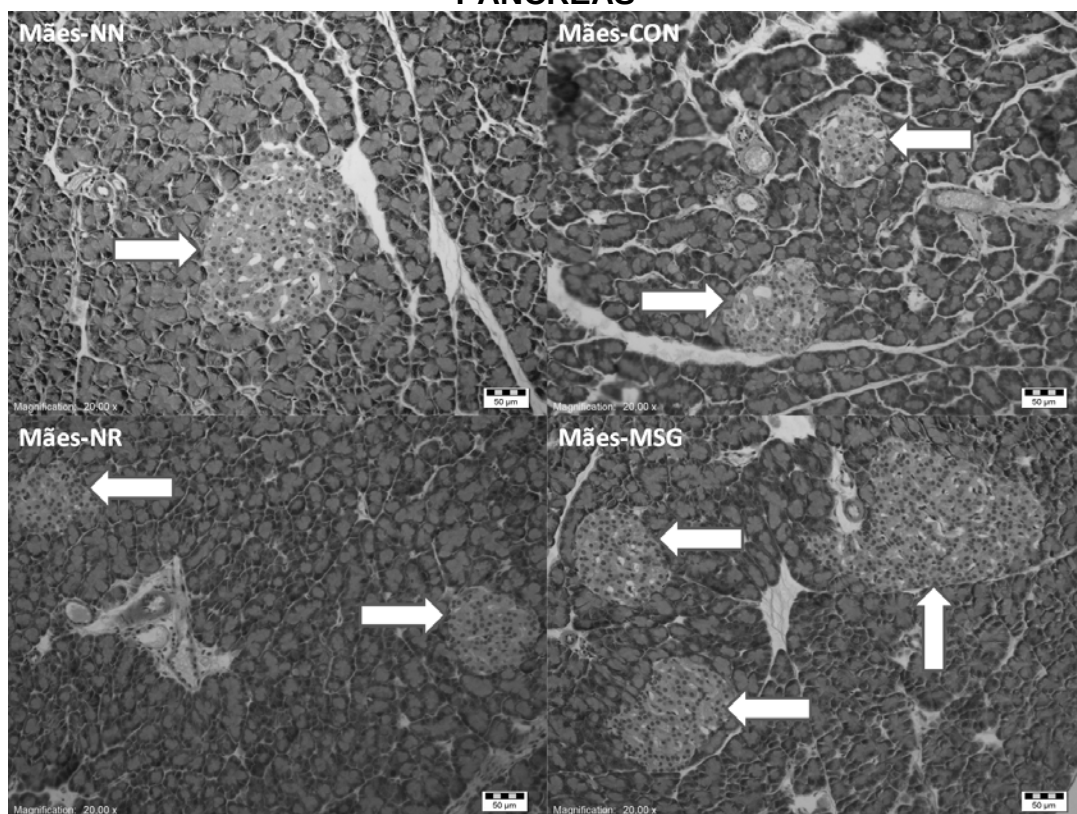


FIGURA 14 – Efeito da manipulação da prole na morfologia do pâncreas das mães: Histologia dos pâncreas das mães corados com H&E. As setas nas imagens indicam a localização da(s) Ilhota(s) de Langerhans (aumento de 200x). Os gráficos representam a média $\pm$ epm da área média em μm^2 (A e B) e número de ilhotas por campo (C e D) dos grupos de Mães-NN e NR e Mães-CON e MSG. n=12-15 lâminas por grupo. O símbolo sobre a barra representa diferença estatística de $p < 0,05$ no teste t de Student. *Mães-NN versus Mães-NR; #Mães-CON versus Mães-MSG.

5.8 PROLE

Conforme mostram os dados da Figura 15, aos 90 dias de vida, os filhotes, apresentaram aumento de 26% e 121% no conteúdo de gordura retroperitoneal, respectivamente nos Filhotes-NR e Filhotes-MSG em relação aos seus controles (p<0,05).

GORDURA RETROPERITONEAL DA PROLE

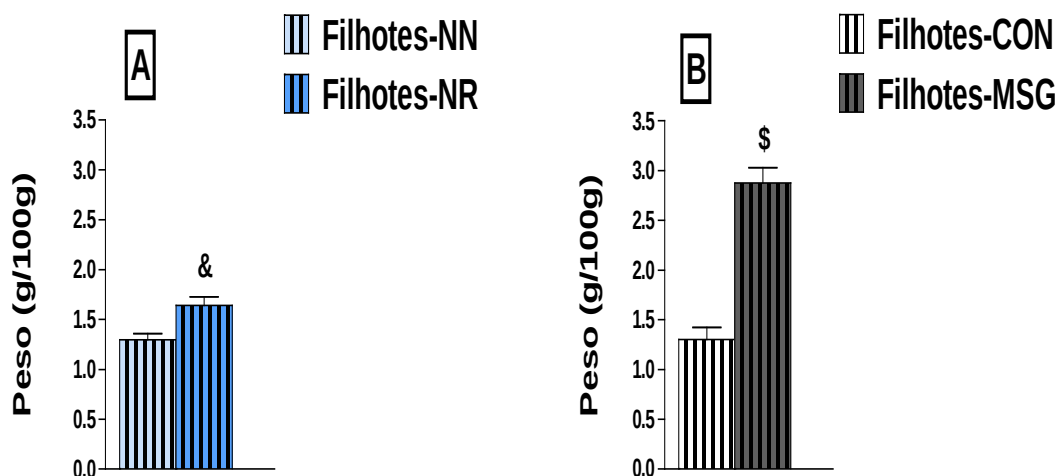


Figura 15- Peso da gordura retroperitoneal da prole (g/100g aos 90 dias). Os dados representam a média $\pm$ epm, n=26-33 para todos os grupos. Os símbolos acima das barras representam diferenças significativas de p<0,05 no teste t de Student. &Filhotes-NN versus Filhotes-NR; \$Filhotes-CON versus Filhotes-MSG.

6 DISCUSSÃO

Estudos recentes têm demonstrado claramente que as inter-relações neuro-hormonais entre mães e filhos durante a gestação e a lactação podem determinar o metabolismo e o estado de saúde dos filhotes na vida adulta (HABBOUT et al., 2013; PORTHA et al., 2013; O'DOWD; STOCKER, 2013). Dentro deste contexto, a maioria dos estudos explora os efeitos da obesidade na prole. Todavia, nosso estudo registrou as adaptações maternas oriundas da manipulação da prole durante o período lactacional em dois modelos clássicos de obesidade: o modelo de programação metabólica e o modelo MSG.

A obesidade é marcada pelo excesso de adiposidade visceral que pode ser promovida pelas características metabólicas e neurais dos dois modelos (DOLNIKOFF et al., 2001; CUNHA, 2007; FONSECA-ALANIZ et al., 2007; BRANDEBOURG; HUGO; BEN-JONATHAN, 2007). No modelo de obesidade por programação metabólica, promovido pela redução do número de filhotes da prole no período neonatal, ocorrem alterações nas sinalizações hipotalâmicas entre o ARQ e NPV que induzem à hipernutrição da prole e à obesidade na idade adulta (PLAGEMANN; HARDER; RAKE; VOITS; et al., 1999). O outro modelo de obesidade é promovido pela lesão hipotalâmica por MSG que também atinge o ARQ, ativa neste local a apoptose e ocasiona a descontinuidade da sinalização hipotalâmica de saciedade e fome, que pré-dispõe os indivíduos à obesidade na idade adulta, entretanto apresentam hipo ou normofagia (MARTINS et al., 2001). Conforme demonstraram nossos dados, os ratos adultos Filhotes-NR e Filhotes-MSG apresentaram excesso de tecido adiposo visceral, comprovando a eficácia destes tratamentos para indução de obesidade na vida adulta. Estes dados são concordantes com estudo de Morrison et al (2008) que relata que quando adultos os animais MSG apresentam excesso de tecido adiposo e características da SM. Ratos adultos oriundos de ninhadas reduzidas apresentam hiperfagia, reduzido gasto energético e acúmulo de gordura retroperitoneal. A obesidade MSG é primariamente promovida pela redução da atividade do SNS, acompanhada de aumento nos níveis de insulina que favorecem a lipogênese (LAU; TYMIANSKI, 2010; MIRANDA et al., 2013). Em ambos os modelos, os efeitos sobre a prole já estão bem estabelecidos na literatura, porém em nenhum deles foi avaliada a morfofisiologia materna.

A homeostase energética materna é alterada durante a lactação, primariamente pela alta demanda energética necessária para a produção de leite (PRIEGO et al., 2013). Estudos em ratos demonstram que durante a lactação ocorre aumento de até 300% na ingestão de alimentos e isso é acompanhado por hipertrofia do trato intestinal (100%) para permitir uma absorção mais rápida dos nutrientes. Há também a hipertrofia da glândula mamária (cerca de 400%), fígado (cerca de 40-50%) e do coração. Resultados similares foram obtido nos estudos de Krol et al (2011). Isso porque a lactação é o período mais exigente em termos energéticos durante a vida de uma fêmea, conforme afirmou Nogueira Neto (2008). Dentro deste contexto, nossos dados demonstraram que a ingestão alimentar de Mães-NR e MSG durante o período lactacional foi reduzida pela manipulação da prole. Em Mães-NR esta redução na ingesta alimentar está provavelmente relacionada a menor demanda energética para alimentar uma prole menor.

Segundo, Woodside e Popeski (1998) o estímulo da sucção é fundamental para o grau de liberação de prolactina e consequente produção do leite. Estes autores ainda demonstram que o principal estímulo para a lactação é o número de mamilos sugados, portanto, quanto menor número de filhotes recebe um menor estímulo lácteo. Este fator também tem impacto no grau de liberação de prolactina. Considerando que a prolactina contribui para hiperfagia característica da lactação, acredita-se que ocorre o menor estímulo em Mães-NR por possuírem um número menor de filhotes (WOODSIDE; POPESKI, 1998). Neste sentido, os estudos de Brandebourg e outros (2007), mostram que o tamanho da ninhada, interfere na ingestão materna de alimentos, que por sua vez, interfere no tamanho da massa intestinal e a capacidade de absorção de nutrientes (BRANDEBOURG; HUGO; BEN-JONATHAN, 2007).

Todavia em Mães-MSG não é o número de filhotes da prole que determina alterações da ingesta alimentar. Segundo Schoelch et al (2002) as altas concentrações de MSG aplicados no período neonatal promovem destruição maior das células de síntese do NPY do que das células de síntese de POMC, que são menos suscetíveis a destruição. O resultado desta destruição foi verificado pela redução da ingestão de leite materno e esta ingestão reduzida de alimentos persiste na vida adulta. Este perfil hipofágico faz parte dos eventos ligados às alterações da atividade autonômica característica deste modelo (MORRISON et al., 2008;

MIYATA; MINAI; HAGA, 2009). Adicionalmente, ratos MSG apresentam massa muscular reduzida promovida pela queda do GH (LAU; TYMIANSKI, 2010). Assim, sugere-se que ninhadas MSG apresentem menor atividade de sucção, o que promoveria redução do volume de leite ingerido exigindo menor demanda das Mães-MSG. Neste sentido, estudos científicos sugerem que normalmente a ingestão do leite é regulada por apetite do filhote e não pela capacidade da mãe produzir leite (DEWEY; LÖNNERDAL, 1986; MCCLELLAN; MILLER; HARTMANN, 2008; HEITMANN et al., 2012).

Acompanhando a ingesta alimentar, também se observou redução na ingesta hídrica. Considerando que o componente aquoso do leite é bastante significativo o aumento da ingestão líquida durante a lactação favorece a produção do leite (ZHAO; KEATING, 2007). Dentro deste contexto, estudo em vacas demonstra que a restrição na ingestão de água promove uma redução na produção de leite. Adicionalmente, a ingesta hídrica também pode ser afetada pelo tamanho corporal, sendo assim, quanto maior o peso do corpo maior o consumo de água (MEYER et al., 2004). É provável que a redução na ingesta de água observada em nosso estudo tenha relação com a menor produção de leite.

Modulações do balanço energético podem ser refletidas em variações do peso corporal, afetando as massas musculares e adiposas. Estudos em humanos têm demonstrado que mães que amamentam perdem aproximadamente 0,44 kg por mês devido ao balanço energético negativo deste período (KAC et al., 2004). No presente trabalho as Mães-NR não apresentaram variações do peso corporal, apesar da menor ingesta. O que reforça nossa hipótese de que a redução do número de filhotes da prole promove menor demanda energética durante a amamentação. Por outro lado, Mães-MSG apresentaram um pequeno aumento no peso corporal, que se atribui à diferença de peso que já havia na formação dos grupos e foi mantida durante a lactação.

Nosso trabalho também encontrou que ambos os processos de manipulação da prole elevam o teor de triglicerídeos, glicose e insulina no plasma das mães ao final da lactação. Conforme mostra os estudos de Neville; McFadden e Forsyth (2002) o aumento dos TG plasmáticos durante a lactação é oriundo das partículas transportadoras de gordura VLDL e quilomicrons, ambos são direcionados a síntese do leite. Similarmente durante a lactação as mães apresentam também aumento da síntese hepática de glicose, acompanhado de queda da insulina, o que favoreceria o

aumento de glicose sanguínea para síntese de carboidratos no leite (RUDOLPH et al., 2007). Todavia, embora TG e carboidratos estejam elevados nosso estudo encontrou níveis elevados de insulina no plasma das mães de ambos os grupos. Este dado indica indiretamente que está ocorrendo RI, uma vez que, embora a insulina esteja elevada, isto não é suficiente para baixar os níveis de glicose. Conforme será descrito posteriormente o teor de gordura visceral das mães nos dois modelos estudados estava elevado, o que pode também estar ligado a instalação de RI. Estas alterações plasmáticas são importantes uma vez que, estes nutrientes podem ser usados para síntese do leite, alterando sua composição. Dentro deste contexto, Bartol; Wiley e Bagnell (2008), enfatizam a importância da transmissão de sinais maternos lactócrino vindas do leite como elementos da programação epigenética na prole que pode favorecer a instalação de obesidade. Por exemplo, ratas alimentadas com uma dieta rica em gordura durante a gestação e lactação, apresentam aumento significativo no teor de gordura do leite no período de lactação, o que pode contribuir para mudanças, à longo prazo, no peso corporal e adiposidade dos filhotes (PURCELL et al., 2011). A redução da utilização da glicose por outros tecidos é justificada por Sanchez-Muniz et al (2012) como estratégia importante para assegurar glicose ao cérebro materno e à GM. Para completar este quadro do metabolismo materno, ocorre durante a lactação o aumento da glicemia em decorrência da demanda deste carboidrato pela GM na produção do leite. Em detrimento, o tecido muscular, tem menor captação da glicose, simulando uma resistência periférica à insulina, porém a sensibilidade à ela nos outros tecidos permanece alta (BURNOL et al., 1986)

Considerando o alterado perfil plasmático e a possibilidade desses elementos estarem também em excesso no leite, a composição do leite materno foi avaliada nos dois modelos. Apenas o leite de Mães-NR apresentou alterações na composição, com maior teor de TG e consequente aumento de calorias. Este dado confirma outros estudos, tais como, o realizado por Nogueira Neto (2008) em ratos com programação metabólica por redução de ninhada. Segundo este autor o aumento na taxa de crescimento dos filhotes pode ser influenciado não só pelo aumento de 20% a 30% no consumo de leite, mas pode estar relacionado a maior concentração de lipídeos encontrada na composição do leite de ratas que amamentavam três ou quatro filhotes (ninhada reduzida). Similarmente, CUNHA (2007) também demonstrou que o leite produzido pelas lactantes das ninhadas

reduzidas apresenta maior concentração de triglicerídeos e esta modificação qualitativa da relação entre os nutrientes, é sugerido por Cunha como determinante nas respostas adaptativas observadas nos animais das NR, mas não é interpretado como resultado da manipulação, mas sim como tentativa fisiológica da mãe em prover melhores condições para sua prole que já está restrita (CUNHA, 2007). A insulina estimula a síntese de lipídios do leite (LORENSON et al., 2012) assim é também possível que os elevados níveis de insulina em Mães-NR tenham contribuído para elevar TG no leite.

Por outro lado, não há nenhum estudo avaliando o leite de Mães-MSG e neste caso, nossos dados indicam que não houve relação entre os parâmetros plasmáticos e a composição do leite, visto que, o leite de Mães-MSG não apresentou mudança na composição ou caloria, embora as Mães-MSG também tenham apresentado alterações plasmáticas similares às das Mães-NR. Desta forma, a obesidade MSG observada nos filhotes é atribuída à lesão hipotalâmica e não a mudanças da composição do leite materno. Isso sugere que alterar o número de filhotes da prole tem impactos na composição do leite. Porém como neste trabalho só foi verificada a composição do leite no último dia de lactação, como sugestão para trabalhos futuros, vê-se que estas variáveis também devem ser investigadas em outras fases da lactação, visto que os períodos de maior demanda energética da lactação, estão em torno do 10º ao 15º dia de lactação. Neste período os filhotes ainda estão com a lactação como única fonte energética, a partir deste período gradativamente eles vão inserindo a alimentação sólida até concluir o desmame próximo do 21º (DEWEY; LÖNNERDAL, 1986).

Novas evidências sugerem que o conteúdo celular do leite materno é influenciado pelo estado de saúde tanto da mãe quanto da criança (HASSIOTOU; GEDDES; HARTMANN, 2013). Investigação recente, sobre alterações nos fatores imunológicos no leite materno humano, descobriu que aumenta o conteúdo de leucócitos no leite das mães, durante infecções respiratórias ou gastrointestinais de suas crianças e, em seguida, diminui significativamente no período de convalescência (RISKIN et al., 2011). Isso ocorre porque os leucócitos e outras moléculas do sistema imunológico são transferidos para a GM e desta para o leite materno (HASSIOTOU; GEDDES; HARTMANN, 2013). Neste trabalho o aumento do número de leucócitos no leite foi registrado nas Mães-MSG. Resultados

semelhantes também foram encontrados em outro estudo, onde o leite materno de mães de crianças hospitalizadas com bronquiolite mostrou um maior número de leucócitos e citocinas direcionadas para o vírus sincicial respiratório, que é o principal organismo responsável pela bronquiolite (BRYAN et al., 2007). É possível que os microorganismos da criança ou sinais da imunidade inata possam ser transferidos para o peito, o mais provável durante uma pausa na amamentação, estimulando uma resposta imune local, através de um refluxo ductal durante a ejeção do leite (HASSIOTOU et al., 2013). Mas também existe evidências para outro link imunológico entre a mãe e seus filhos, que pode estar na transmissão de sinais na saliva ou outra secreção, resultando em um leite personalizado (BRYAN et al., 2007; HASSIOTOU; GEDDES; HARTMANN, 2013).

A lactação é regulada por hormônios como leptina, prolactina e insulina, que juntos coordenam a diferenciação celular, bem como a secreção láctea. A GM é o órgão exclusivo para a produção do leite propriamente dita, sendo ela quem determina quais componentes serão repassados para o leite. É uma maquinaria complexa e de refinado controle (PICÓ et al., 2007). Considerando a importância da GM para a síntese do leite e as mudanças observadas no metabolismo e no leite materno, nosso trabalho avaliou a morfologia da GM em ambos os modelos. As maiores mudanças morfológicas observadas na GM de ambos os grupos de mães foi o elevado teor de adipócitos, acompanhado de redução do número de ácinos. De acordo com o Carré e Binart (2013), os adipócitos da GM têm plasticidade podendo em caso de alterações fisiológicas ocorrerem a inativação dos ácinos que são substituídos por adipócitos. Esta característica do tecido mamário poderia ser relacionada a redução gradativa do volume do leite mamado. Porém, a involução propriamente dita só tem início após o terceiro dia sem estímulo da sucção nos mamilos e conseqüentemente sem a secreção da prolactina (CARRÉ; BINART, 2013). Mas segundo Hernandez (2012), impactos negativos sobre o desenvolvimento da GM durante a gravidez, podem ser responsáveis pela degradação dos alvéolos mamários. A partir destes impactos negativos a produção de leite pode ser comprometida por redução dos alvéolos (HERNANDEZ et al., 2012). Por exemplo, em ratos, o tamanho do alvéolo, bem como, o número destes na GM podem diminuir por problemas maternos como a hipertensão, hormônio placentário insuficiente, obesidade, deficiência de vitamina A e deficiência de zinco.

Adicionalmente, a hipernutrição e obesidade também têm sido implicados em modelos animais, na diminuição do potencial produtivo de leite e lactogênese (MEYER et al., 2004). Segundo estudos de Probyn et al (2013) para que a lactação seja efetivada é necessária além da sucção dos neonatos, que a GM tenha passado pelo desenvolvimento adequado para produzir leite de qualidade e quantidade suficientes. Juntos estes achados nos permitem sugerir que a maior quantidade de adipócitos observadas nas GMs pode ser atribuída ao excesso de tecido adiposo encontrado nas mães, conforme descrito abaixo. Também é importante afirmar que o desenvolvimento mamário está sobre o controle endócrino de hormônios como a PRL e ocitocina (NEVILLE et al., 2012). Ambos são produzidos em quantidade proporcional ao estímulo do mamilo, assim, é provável que a redução do número de filhotes da prole, bem como a menor sucção em ratos MSG, promova um menor estímulo mamário e consequente menor liberação de PRL e ocitocina.

Apesar da redução na ingestão alimentar e manutenção do peso corporal, foi observado que as manipulações da prole afetaram a composição corporal elevando o teor de TAB em ambos os grupos. O TAB regula a homeostase energética através de sua capacidade para armazenar e liberar lipídeos (FRÜHBECK, 2008). Dados a respeito dos depósitos de gordura, como peso e características teciduais têm sido estudados nos últimos anos, visando melhor compreensão dos processos envolvidos no acúmulo de gordura (BRANDEBOURG; HUGO; BEN-JONATHAN, 2007). Neste sentido avaliou-se os valores médios de peso, dos depósitos de gordura periovariana, retroperitoneal, sendo estes dois, dos três representantes do TA visceral. De acordo com Brandebourg; Hugo e Ben-Jonatan (2007) o acúmulo de tecido visceral está mais diretamente relacionado a instalação de RI e patologias, tais como o DM2 . A lactação é um período de mobilização do TAB, marcado por intensa lipólise nos seus depósitos. Consequentemente os níveis de leptina são diminuídos, contribuindo para a hiperfagia comentada anteriormente (VERNON, 2005). Assim, o excesso de gordura visceral observada em Mães-NR e Mães-MSG, ao final da lactação pode indicar que a presença de obesidade seja provavelmente por hiperleptinemia. Portanto a determinação bioquímica da leptina no plasma deve ser incluída em trabalhos futuros.

O tamanho do adipócito é um evento crítico na produção de adipocinas, bem como, reflete no papel deste adipócito para o metabolismo de lipídios. Adipócitos hipertrofiados apresentam um perfil inflamatório e maior liberação de AGL na corrente sanguínea (BRANDEBOURG; HUGO; BEN-JONATHAN, 2007). Nosso estudo demonstra que o maior teor de gordura nas mamas de ambos os grupos foi acompanhado de hipertrofia dos adipócitos, em especial do tecido adiposo retroperitoneal. Sendo assim, é provável que estas mamas apresentem alterações nos níveis de adipocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF e IL6 com maior predisposição a RI e DM2. Os parâmetros metabólicos apresentados abaixo podem favorecer nossa hipótese. Foi também observado que as variações morfológicas foram diferentes dependendo do depósito avaliado, neste sentido, o depósito retroperitoneal foi mais susceptível a hipertrofia. Similares observações foram feitas recentemente por Saremi et al.(2014) estudando diferentes aspectos do TAB durante a lactação em vacas. Adicionalmente, tais alterações da responsividade do TAB, com características de crescimento tecidual distintas, podem indicar diferentes receptores expressos em cada depósito, respondendo para os mesmos hormônios de maneira diferente, como citado por Lorensen et al (2012).

Na avaliação do TA, inclui-se o TAM por ser considerado importante componente no balanço energético. Em geral, durante a lactação, este tecido fica sem atividade lipolítica ou com ela reduzida, por este período ser caracterizado pela redução do gasto energético nos demais tecidos que não a GM. A regulação negativa da atividade do TAM durante a lactação pode ser previamente considerada como um mecanismo de economia de energia para maximizar a energia possível para a produção de leite (XIAO et al., 2007). Porém, outra forma de explicar a regulação negativa do TAM durante a lactação é em razão da produção de leite produzir uma quantidade de calor lactogênico que a lactante necessita dissipar (KRÓL et al., 2011). Isto sugere que a termogênese do TAM pode decair diretamente como consequência da produção do calor termogênico para a síntese do leite, mantendo a rata em termoneutralidade (CANNON; NEDERGAARD, 2004). No caso das Mães-NR ocorre o inverso, com a redução da ninhada a produção de calor lactacional é pequena, ou menor que de seu controle, portanto seu TAM retorna à atividade. Para a conversão dos nutrientes para a síntese do leite, na GM, ocorrem gastos metabólicos, em torno de 24 a 43% de toda a energia metabolizada

da ingestão. Dentre estes gastos está a dissipação de calor (KRÓL et al., 2011). Este é outro motivo para o TAM não necessitar estar ativo durante a lactação, sendo que a prolactina, que se encontra em níveis circulantes elevados neste período é quem garante a regulação negativa da atividade do TAM (KRÓL et al., 2011).

No presente trabalho, a manipulação na prole apresentou consequências no TAM apenas do grupo de Mães-NR. Neste grupo, foi observada a ausência de gotículas de gordura de tamanho médio ou grande e presença de maior número de células por campo. A redução da gordura e hipotrofia do tecido deve-se a um provável consumo energético, caracterizando hiperatividade do tecido supondo uma aceleração do metabolismo via SNS nesse grupo de mães. Segundo estudos a ativação do SNS para o TAM também estimula a proliferação celular via receptores beta adrenérgicos (LEITNER; BARTNESS, 2009). Adicionalmente, durante a lactação, o TAM também é regulado pela leptina. Na presença da leptina, os receptores de leptina presentes no TAM desencadeiam a sinalização ativando o TAM e estimulando a termogênese. Mas, na sua ausência, ocorre a regulação negativa da termogênese (KRÓL et al., 2011). Portanto, a reativação do TAM das Mães-NR durante a lactação pode estar relacionada a elevação dos níveis de leptina, que leva ao gasto energético e redução da ingesta alimentar, sugerindo um possível balanço energético positivo, por possuir menor número de filhotes na prole, com demanda energética menor, retome a atividade normal do TAM. Para tanto seria necessária uma avaliação da expressão das UCP1 e da atividade mitocondrial do TAM para melhor esclarecer o processo.

As mudanças na lactação inibem o SNS, promovendo a redução do gasto energético nos tecidos não mamários, canalizando as energias para a amamentação (ZAGOORY-SHARON et al., 2008). Tais mudanças seguem pelo metabolismo energético materno, sendo que Neville et al (2002) descreve que na lactação, níveis plasmáticos de insulina são mais baixos do que durante a gestação ou de antes da gestação. Sabe-se que durante a transição da gestação para a lactação a adaptação materna é caracterizada por perda da massa de células β , e a secreção de insulina é inibida pela lactação (LELLIS-SANTOS et al., 2012). Sabendo-se da inter-relação da insulina com a amamentação é que também foi aqui avaliado o impacto das manipulações da prole sobre o pâncreas endócrino. Entretanto, no grupo das Mães-NR, a secreção de insulina estava aumentada sem estar acompanhada da alteração

no tamanho das ilhotas pancreáticas. Embora os mecanismos moleculares que estão por trás da programação adaptativa das células β ainda sejam pouco compreendidos, já está estabelecido que mudanças crescentes na adiposidade e ou excesso na alimentação podem afetar a capacidade de manutenção da massa de células β (ALFARADHI; OZANNE, 2011; O'DOWD; STOCKER, 2013; PATEL; ABATE, 2013). A redução do tamanho médio das ilhotas pode estar relacionada a esta perda de massa de células β . Para tanto seria necessário pesquisar a ocorrência de apoptose em trabalhos futuros para dirimir as dúvidas.

Uma das mais diretas inferências sobre o tamanho das ilhotas de Langerhans de ratos reside no fato de quanto maior for o diâmetro, por conseguinte maior será a área das mesmas e maior será a secreção de insulina (REAVEN et al., 1981). HAYECK e WOODSIDE (1979) observaram que em ratos obesos com hiperinsulinemia, ocorre hipertrofia de ilhotas pancreáticas. Esses autores citaram ainda que a secreção de insulina aumenta diretamente em função do aumento de tamanho das ilhotas pancreáticas. Em ambos os modelos avaliados no presente trabalho, as mães apresentaram aumento nos níveis de insulina. Porém, somente nas Mães-MSG o aumento de insulina no plasma foi acompanhado de hipertrofia da ilhota. Entretanto, considerando que as ilhotas pancreáticas apresentam mais de 5 subtipos celulares, é possível que outros tipos celulares possam ter sido afetados. Neste caso, estudos futuros que avaliem a proporção de células nas ilhotas, bem como o tipo do tecido conjuntivo seriam também importantes.

Por fim, pesquisas sobre a vulnerabilidade dos humanos modernos à doença, afirmam que a maioria delas está ligada às perturbações durante períodos críticos no desenvolvimento da vida fetal e neonatal. Estas perturbações são provocadas por sinais ambientais frequentemente gerados ou transduzidos pela mãe e depende de uma série de moléculas de sinalização, incluindo nutrientes, imunoglobulinas, fatores de crescimento, hormônios e inclusive microrganismos, que servem para orientar o desenvolvimento normal, mas também pode variar em resposta às condições ambientais (POWER; SCHULKIN, 2013). Deste modo e considerando a lactação uma importante janela crítica do desenvolvimento, foi possível observar que não apenas a prole, mas o metabolismo e a fisiomorfologia materna são adaptadas aos eventos que modulam a prole. Essas interações entre mães e filhos são, portanto, vias de mão-dupla que determinam modificações em ambos.

7 CONCLUSÃO

A análise dos dados demonstra que as manipulações da prole promovidas pela redução do número de filhotes e pelo tratamento químico com MSG durante a lactação, nas condições metodológicas de manipulação dos animais aqui avaliados, promoveram as seguintes adaptações maternas:

- i) Elevação do teor de gordura corporal;
- ii) Alteração do perfil lipídico e de carboidratos do plasma materno;
- iii) Elevação dos níveis circulantes de insulina no plasma materno;
- iv) Modificação da composição do leite;
- v) Alterações na morfologia da glândula mamária;
- vi) Alteração da histomorfologia do pâncreas endócrino.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFARADHI, M. Z.; OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. **Frontiers in genetics**, v. 2, 2011.

ANDERSON, S. M. et al. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis. **Breast Cancer Research**, v. 9, p. 204-217, 2007.

ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160-1171, 2012.

ASSUMPÇÃO, R. P. et al. Effect of variation of *trans*-fatty acid in lactating rats' diet on lipoprotein lipase activity in mammary gland, liver, and adipose tissue. **Nutrition**, v. 20, n. 9, p. 806-811, 2004.

BARBOUR, L. A. et al. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. **Diabetes care**, v. 30, n. Supplement 2, p. S112-S119, 2007.

BARSH, G. S.; SCHWARTZ, M. W. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 8, p. 589-600, 2002.

BARTOL, F.; WILEY, A.; BAGNELL, C. Epigenetic programming of porcine endometrial function and the lactocrine hypothesis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. s2, p. 273-279, 2008.

BARTOL, F. et al. LACTATION BIOLOGY SYMPOSIUM: Lactocrine signaling and developmental programming. **Journal of animal science**, v. 91, n. 2, p. 696-705, 2013.

BAYS, H. E. et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. **Expert Reviews of Cardiovascular Therapy**, 2008.

BRAGULLA, H.; KÖNIG, H. Glândula Mamária nos Animais Domésticos. In: (Ed.). **Anatomia dos Animais Domésticos: texto e atlas colorido**, v.2, 2004. p.325-380.

BRANDEBOURG, T.; HUGO, E.; BEN-JONATHAN, N. Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. 4, p. 464-476, 2007.

BRASIL; ANVISA. **Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos**. 2008. 160 p

BRYAN, D. L. et al. Immunomodulatory constituents of human milk change in response to infant bronchiolitis. **Pediatric allergy and immunology**, v. 18, n. 6, p. 495-502, 2007.

BUCHANAN, T. A. et al. What is gestational diabetes? **Diabetes care**, v. 30, n. Supplement 2, p. S105-S111, 2007.

BUENAÑO ZAMBRANO, V. M. Determinación de Buenas Prácticas de Producción de Ratas (*Rattus norvegicus*) en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia.[Incluye Manual de Uso y Cuidado de Animales de Experimentación]. 2012.

BUENO, A. et al. Lipid metabolism of monosodium glutamate obese rats after partial removal of adipose tissue. **Physiological Research**, v. 54, n. 1, p. 57-65, 2005.

BURNOL, A. et al. Increased insulin sensitivity and responsiveness during lactation in rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 251, n. 5, p. E537-E541, 1986.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 277-359, 2004.

CARRÉ, N.; BINART, N. Prolactin and adipose tissue. **Biochimie**, 2013.

CARVALHEIRA, J. B.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CINGOLANI, H.; HOUSSAY, A. **Fisiologia Humana de Houssay**. 2004.

CINTI, S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 297, n. 5, p. E977-E986, 2009.

COLLARES, F. P.; GONÇALVES, C. V.; FERREIRA, J. S. Creamatocrit as a rapid method to estimate the contents of total milk lipids. **Food chemistry**, v. 60, n. 4, p. 465-467, 1997.

CORNIER, M.-A. et al. The metabolic syndrome. **Endocrine reviews**, v. 29, n. 7, p. 777-822, 2008.

COSTA, J. V.; DUARTE, J. S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Médica Portuguesa**, v. 19, n. 3, p. 251-6, 2006.

COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. **Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CRUME, T. L. et al. Long-term impact of neonatal breastfeeding on childhood adiposity and fat distribution among children exposed to diabetes in utero. **Diabetes care**, v. 34, n. 3, p. 641-645, 2011.

CUNHA, A. C. D. S. R. **Influência da hiperalimentação na lactação sobre o processo de estímulo-secreção de insulina in vitro**. 2007. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

DEL PRADO, M.; DELGADO, G.; VILLALPANDO, S. Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 3, p. 458-462, 1997.

DESAI, M.; BABU, J.; ROSS, M. G. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 6, p. R2306-R2314, 2007.

DESPRÉS, J.-P. et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 28, n. 6, p. 1039-1049, 2008.

DESPRÉS, J. Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. **Nutrition**, v. 9, n. 5, p. 452, 1993.

DEWEY, K. G.; LÖNNERDAL, B. Infant Self-Regulation of Breast Milk Intake. **Acta Paediatrica**, v. 75, n. 6, p. 893-898, 1986.

DIMITRIADIS, G. et al. Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes research and clinical practice**, v. 93, p. S52-S59, 2011.

DOLNIKOFF, M. et al. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 25, n. 3, p. 426-433, 2001.

DRAZNIN, B.; MELMED, S.; D, L. Molecular and Cellular Biology of Diabetes Mellitus. v. 1, 1989.

DRUCKER, D. J. Incretin action in the pancreas: Potential promise, possible perils, and pathological pitfalls. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 3316-3323, 2013.

ECHEVERRY, D. M.; PENAGOS, F.; RUIZ-CORTÉS, Z. T. Role of leptin and its receptor on bovine mammary gland. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 25, n. 3, p. 500-510, 2012.

ELMQUIST, J. K.; ELIAS, C. F.; SAPER, C. B. Hypothalamic control of body weight. **Neuron**, v. 22, p. 221-232, 1999.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. How palatable food disrupts appetite regulation. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 97, n. 2, p. 61-73, 2005.

ESPOSITO, K. et al. Metabolic Syndrome and Risk of Cancer A systematic review and meta-analysis. **Diabetes care**, v. 35, n. 11, p. 2402-2411, 2012.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 911-919, 2005.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, p. S192-S203, 2007.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763-770, 1998.

FRÜHBECK, G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. In: (Ed.). **Adipose Tissue Protocols**: Springer, 2008. p.1-22. ISBN 1588299163.

GALLAGHER, E. J.; LE ROITH, D. Epidemiology and Molecular Mechanisms Tying Obesity, Diabetes, and the Metabolic Syndrome With Cancer. **Diabetes care**, v. 36, n. Supplement 2, p. S233-S239, 2013.

GENTRIC, G.; DESDOUETS, C.; CELTON-MORIZUR, S. Hepatocytes polyploidization and cell cycle control in liver physiopathology. **International journal of hepatology**, v. 2012, 2012.

GERMAN, J. B.; DILLARD, C. J. Saturated fats: a perspective from lactation and milk composition. **Lipids**, v. 45, n. 10, p. 915-923, 2010.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 415-445, 2011.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 5, p. 367-377, 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. Elsevier, 2006. ISBN 8535216413.

HABBOU, A. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short-and Long-Term Pathophysiological Consequences. **The Journal of nutrition**, v. 143, n. 5, p. 553-562, 2013.

HALES, C. N.; BARKER, D. The thrifty phenotype hypothesis. **British medical bulletin**, v. 60, p. 5, 2001.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595-601, 1992.

HANLEY, B. et al. Metabolic imprinting, programming and epigenetics-a review of present priorities and future opportunities. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S1, p. S1-S25, 2010.

HARISHANKAR, N. et al. Obesity associated pathophysiological & histological changes in WNIN obese mutant rats. **The Indian journal of medical research**, v. 134, n. 3, p. 330, 2011.

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. T.; HARTMANN, P. E. Cells in Human Milk State of the Science. **Journal of Human Lactation**, v. 29, n. 2, p. 171-182, 2013.

HASSIOTOU, F. et al. Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. **Clinical & Translational Immunology**, v. 2, n. 4, p. e3, 2013.

HEITMANN, B. et al. Obesity: lessons from evolution and the environment. **obesity reviews**, v. 13, n. 10, p. 910-922, 2012.

HENNIGHAUSEN, L.; ROBINSON, G. W. Information networks in the mammary gland. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 9, p. 715-725, 2005.

HERMSDORFF, H. H.; MONTEIRO, J. B. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema?; Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 803-811, 2004.

HERNANDEZ, L. L. et al. High fat diet alters lactation outcomes: possible involvement of inflammatory and serotonergic pathways. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e32598, 2012.

HETHERINGTON, A.; RANSON, S. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **The Anatomical Record**, v. 78, n. 2, p. 149-172, 1940.

HOLLIDAY, R. Epigenetics: a historical overview. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 76-80, 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-867, 2006.

JIALAL, I. Adipose Tissue Dysfunction in Nascent Metabolic Syndrome. **Journal of obesity**, v. 2013, 2013.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAC, G. et al. Breastfeeding and postpartum weight retention in a cohort of Brazilian women. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 3, p. 487-493, 2004.

KENNEDY, G. The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 9-17, 1957.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2556, 2004.

KITZINGER, H.; KARLE, B. The epidemiology of obesity. **European Surgery**, p. 1-3, 2013.

KOJIMA, M. et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 656-660, 1999.

KRÓL, E. et al. Negative correlation between milk production and brown adipose tissue gene expression in lactating mice. **The Journal of experimental biology**, v. 214, n. 24, p. 4160-4170, 2011.

LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 460, n. 2, p. 525-542, 2010.

LEE, J. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 Diabetes. **Archives of pharmacal research**, v. 36, n. 2, p. 208-222, 2013.

LEITE, E. D. et al. Proliferação, apoptose e histomorfometria da glândula mamária de ratas tratadas com tiroxina na lactação e ao desmame e desenvolvimento dos filhotes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 6, p. 1000-1006, 2007.

LEITNER, C.; BARTNESS, T. J. Acute brown adipose tissue temperature response to cold in monosodium glutamate-treated Siberian hamsters. **Brain Research**, v. 1292, n. 0, p. 38-51, 9/25/ 2009.

LELLIS-SANTOS, C. et al. The regulation of Rasd1 expression by glucocorticoids and prolactin controls peripartum maternal insulin secretion. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3668-3678, 2012.

LEVIN, B. E. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1471, p. 1107-1121, 2006.

LIRA, L. Q.; DIMENSTEIN, R. VITAMINA AE DIABETES GESTACIONAL. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 355-9, 2010.

LIU, B. et al. Maternal hematopoietic TNF, via milk chemokines, programs hippocampal development and memory. **Nature neuroscience**, 2013.

LÓPEZ-FONTANA, C. M. et al. The inhibitory effect of progesterone on lactogenesis during pregnancy is already evident by mid-to late gestation in rodents. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 5, p. 704-714, 2012.

LORENSON, M. Y. et al. A major prolactin-binding complex on human milk fat globule membranes contains cyclophilins A and B: the complex is not the prolactin receptor. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 302, n. 5, p. E585-E594, 2012.

LUCAS, A. et al. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. **British medical journal**, v. 1, n. 6119, p. 1018, 1978.

MA, X.; ZHU, S. Metabolic syndrome in the prevention of cardiovascular diseases and diabetes -still a matter of debate? **European journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 5, p. 518-521, 2013.

MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 42, n. 6, p. 413-421, 1998.

MADONNA, R. et al. Glucose Metabolism, Hyperosmotic Stress, and Reprogramming of Somatic Cells. **Molecular biotechnology**, p. 1-10, 2013.

MARINA, N. et al. Suckling-induced activation of neural c-fos expression at lower thoracic rat spinal cord segments. **Brain Research**, v. 954, n. 1, p. 100-114, 2002.

MARTINS, A. C. et al. Monosodium L-glutamate-induced obesity impaired the adrenal medullae activity. **Neuroscience Research Communications**, v. 28, n. 1, p. 49-58, 2001.

MARYNISSEN, G.; MALAISSE, W. J.; VAN ASSCHE, F. A. Influence of lactation on morphometric and secretory variables in pancreatic β -cell of mildly diabetic rats. **Diabetes**, v. 36, n. 8, p. 883-891, 1987.

MASSO-WELCH, P. A. et al. A developmental atlas of rat mammary gland histology. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 5, n. 2, p. 165-185, 2000.

MCCLELLAN, H. L.; MILLER, S. J.; HARTMANN, P. E. Evolution of lactation: nutrition v. protection with special reference to five mammalian species. **Nutrition Research Reviews**, v. 21, n. 2, p. 97-116, 2008.

MCMURRAY, F.; COX, R. D. Mouse models and type 2 diabetes: translational opportunities. **Mammalian Genome**, v. 22, n. 7-8, p. 390-400, 2011.

MCNAMARA, J. P. Role and regulation of metabolism in adipose tissue during lactation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 120-129, 1995.

MELNIK, B. C.; JOHN, S. M.; SCHMITZ, G. Milk is not just food but most likely a genetic transfection system activating mTORC1 signaling for postnatal growth. **Nutrition Journal**, v. 12, p. 103, 2013.

MEYER, U. et al. Investigations on the water intake of lactating dairy cows. **Livestock production science**, v. 90, n. 2, p. 117-121, 2004.

MINTZ, S. W. Comida e antropologia: uma breve revisão. **Revista Brasileira de Ciências Sociais**, 2001.

MIRANDA, R. A. et al. Swim training of monosodium l-glutamate-obese mice improves the impaired insulin receptor tyrosine phosphorylation in pancreatic islets. **Endocrine**, p. 1-8, 2013.

MIRANDOLA, D. A. **Resistência à insulina durante a gestação e lactação de ratas wistar: influências sobre o metabolismo da glicose e da insulina na prole adulta**. 2007. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina

MIYATA, T.; MINAI, Y.; HAGA, M. Association of the suckling-weaning transition with development of the hypothalamic arcuate nucleus neurons in rat pups. **Experimental Animals**, v. 58, n. 1, p. 61-66, 2009.

MOHAMMAD, M. A.; HAYMOND, M. W. Regulation of lipid synthesis genes and milk fat production in human mammary epithelial cells during secretory activation. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 305, n. 6, p. E700-E716, 2013.

MOLINARO, E. **Conceitos e Métodos Para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. 2010.

MORRISON, J. F. et al. Sensory and autonomic nerve changes in the monosodium glutamate-treated rat: a model of type II diabetes. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 2, p. 213-222, 2008.

MUECKLER, M.; THORENS, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 2, p. 121-138, 2013.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 3, p. 193-205, 2008.

NEVILLE, M. C. Anatomy and physiology of lactation. **Pediatric Clinics of North America**, v. 48, n. 1, p. 13-34, 2001.

NEVILLE, M. C. et al. Lactation and neonatal nutrition: defining and refining the critical questions. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 17, n. 2, p. 167-188, 2012.

NEVILLE, M. C.; MCFADDEN, T. B.; FORSYTH, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 7, n. 1, p. 49-66, 2002.

NEVILLE, M. C.; PICCIANO, M. F. Regulation of milk lipid secretion and composition. **Annual review of nutrition**, v. 17, n. 1, p. 159-184, 1997.

NEVILLE, M. C. et al. The insulin receptor plays an important role in secretory differentiation in the mammary gland. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 305, n. 9, p. E1103-E1114, 2013.

NISWENDER, K. D.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 15, n. 8, p. 362-369, 2004.

NOGUEIRA NETO, J. F. **Programação neonatal do perfil lipídico em ratos e ovelhas; Neonatal programming to lipids profile in rats and sheeps**. 2008. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas

NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **The Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 169-181, 2011.

O'DOWD, J. F.; STOCKER, C. J. Endocrine pancreatic development: impact of obesity and diet. **Frontiers in physiology**, v. 4, p. 170, 2013.

OFTEDAL, O. The evolution of milk secretion and its ancient origins. **animal**, v. 6, n. 03, p. 355-368, 2012.

OFTEDAL, O. T. The mammary gland and its origin during synapsid evolution. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 7, n. 3, p. 225-252, 2002.

OLLER, D. N. C.; ILIC, V.; WILLIAMSON, D. H. Re-examination of the putative roles of insulin and prolactin in the regulation of lipid deposition and lipogenesis in vivo in mammary gland and white and brown adipose tissue of lactating rats and litter-removed rats. **Biochemical Journal**, v. 258, p. 273-278, 1989.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 3880, p. 719-721, 1969.

OOSTING, A. et al. Effect of dietary lipid structure in early postnatal life on mouse adipose tissue development and function in adulthood. **British Journal of Nutrition**, p. 1-12, 2013.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 58, n. Suppl. 2, p. 18-28, 2011.

PATEL, P.; ABATE, N. Body Fat Distribution and Insulin Resistance. **Nutrients**, v. 5, n. 6, p. 2019-2027, 2013.

PEDRAZA, N. et al. Impaired expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle during lactation: fibrates and troglitazone reverse lactation-induced downregulation of the uncoupling protein-3 gene. **Diabetes**, v. 49, n. 7, p. 1224-1230, 2000.

PEREIRA, M. J. D. S. **Associação de POMC, NPY e IRS2 hipotalâmicos com padrões de comportamento alimentar em ratos Wistar normais e sobrepeso**. 2009. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas

PEREIRA, R. O. et al. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts. **Regulatory peptides**, v. 136, n. 1, p. 117-121, 2006.

PESCHKE, E.; BÄHR, I.; MÜHLBAUER, E. Melatonin and Pancreatic Islets: Interrelationships between Melatonin, Insulin and Glucagon. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 4, p. 6981-7015, 2013.

PICÓ, C. et al. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. **International journal of obesity**, v. 31, n. 8, p. 1199-1209, 2007.

PINNEY, S. E.; SIMMONS, R. A. Epigenetic mechanisms in the development of type 2 diabetes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 223-229, 2010.

PIPELEERS, D.; MAES, E.; VAN DE WINKEL, M. Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 23, p. 7322-7325, 1982.

PLAGEMANN, A.; HARDER, T. Breast feeding and the risk of obesity and related metabolic diseases in the child. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 3, n. 3, p. 222-232, 2005.

PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the

metabolic syndrome. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 20, p. 4963-4976, 2009.

PLAGEMANN, A. et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain Research**, v. 836, n. 1, p. 146-155, 1999.

PLAGEMANN, A. et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. **Journal of neuroendocrinology**, v. 11, n. 7, p. 541-546, 1999.

PLAGEMANN, A. et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 99, n. 03, p. 154-158, 1992.

PORTHA, B. et al. Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility. **Biochimie**, 2013.

POWER, M. L.; SCHULKIN, J. Maternal regulation of offspring development in mammals is an ancient adaptation tied to lactation. **Applied & Translational Genomics**, 2013.

PRIEGO, T. et al. Maternal Dietary Fat Affects Milk Fatty Acid Profile and Impacts on Weight Gain and Thermogenic Capacity of Suckling Rats. **Lipids**, p. 1-15, 2013.

PROBYN, M. E. et al. The effect of low-to-moderate-dose ethanol consumption on rat mammary gland structure and function and early postnatal growth of offspring. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 10, p. R791-R798, 2013.

PURCELL, R. H. et al. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. **Physiology & behavior**, v. 104, n. 3, p. 474-479, 2011.

RAVELLI, G.-P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **The New England journal of medicine**, v. 295, n. 7, p. 349, 1976.

RÉ, C. F. D. **A leptina e seu papel no sistema nervoso central**. 2012. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre.

REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-1607, 1988.

RIBEIRO, E. B. Studying the central control of food intake and obesity in rats. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 1, p. 163-171, 2009.

RISKIN, A. et al. Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. **Pediatric research**, v. 71, n. 2, p. 220-225, 2011.

RODRIGUES, M. D. C. S. **Diabetes Gestacional**. 2010. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

RORSMAN, P.; BRAUN, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 155-179, 2013.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 847-853, 2006.

RUDOLPH, M. C. et al. Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. **Physiological genomics**, v. 28, n. 3, p. 323-336, 2007.

RUDOLPH, M. C.; NEVILLE, M. C.; ANDERSON, S. M. Lipid synthesis in lactation: diet and the fatty acid switch. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 12, n. 4, p. 269-281, 2007.

RUSSELL, T. D. et al. Cytoplasmic lipid droplet accumulation in developing mammary epithelial cells: roles of adipophilin and lipid metabolism. **Journal of lipid research**, v. 48, n. 7, p. 1463-1475, 2007.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.

SÁNCHEZ-MUNIZ, F.; GESTEIRO, E.; BASTIDA, S. Maternal nutrition during pregnancy conditions the fetal pancreas development, hormonal status and diabetes mellitus and metabolic syndrome biomarkers at birth. **Nutricion hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral**, v. 28, n. 2, p. 250-274, 2012.

SANDER, M.; SHIH, H. P.; WANG, A. Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 29, n. 1, 2013.

SAREMI, B. et al. Longitudinal Profiling of the Tissue-Specific Expression of Genes Related with Insulin Sensitivity in Dairy Cows during Lactation Focusing on Different Fat Depots. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86211, 2014.

SCHOELCH, C. et al. MSG lesions decrease body mass of suckling-age rats by attenuating circadian decreases of energy expenditure. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 283, n. 3, p. E604-E611, 2002.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-671, 2000.

SILVA, R. C. D. et al. Centesimal composition of human milk and physico-chemical properties of its fat. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1535-1538, 2007.

SINGH, S. et al. Lactation driven dynamics of adiponectin supply from different fat depots to circulation in cows. **Domestic Animal Endocrinology**, 2013.

SMORLESI, A. et al. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. **obesity reviews**, v. 13, n. S2, p. 83-96, 2012.

SNITKER, S. et al. The sympathetic nervous system and obesity: role in aetiology and treatment. **obesity reviews**, v. 1, n. 1, p. 5-15, 2000.

STACHOWIAK, E. K. et al. Maternal obesity induced by a high fat diet causes altered cellular development in fetal brains suggestive of a predisposition of offspring to neurological disorders in later life. **Metabolic brain disease**, v. 28, n. 4, p. 721-725, 2013.

SVENNERSTEN-SJAUNJA, K.; OLSSON, K. Endocrinology of milk production. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 241-258, 2005.

SYMONDS, M. et al. Adipose tissue and fetal programming. **Diabetologia**, v. 55, n. 6, p. 1597-1606, 2012.

TIBANA, R. A.; PRESTES, J. Treinamento de Força e Síndrome Metabólica: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v. 26, n. 1, p. 66-76, 2013.

TOLEDO-RODRIGUEZ, M.; SANDI, C. Stress during adolescence increases novelty seeking and risk-taking behavior in male and female rats. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 5, p. 17, 2011.

TZSCHENTKE, B.; PLAGEMANN, A. Imprinting and critical periods in early development. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, p. 626-637, 2006.

VERNON, R. G. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. **Journal of dairy research**, v. 72, n. 04, p. 460-469, 2005.

VORBACH, C.; CAPECCHI, M. R.; PENNINGER, J. M. Evolution of the mammary gland from the innate immune system? **Bioessays**, v. 28, n. 6, p. 606-616, 2006.

WANG, C. D. et al. Creamatocrit and the nutrient composition of human milk. **Journal of Perinatology**, v. 19, n. 5, 1999.

WATERLAND, R. A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 69, n. 2, p. 179-197, 1999.

WATERLAND, R. A.; MICHELS, K. B. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. **Annual review of nutrition**, v. 27, p. 363-388, 2007.

WATSON, C. Immune cell regulators in mouse mammary development and involution. **Journal of animal science**, v. 87, n. 13 suppl, p. 35-42, 2009.

WHITEHEAD, J. P. et al. Signalling through the insulin receptor. **Current opinion in cell biology**, v. 12, n. 2, p. 222-228, 2000.

WHO. Obesity and overweight. 2011. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html> (last accessed: 25 April 2012), 2011.

WOOD, I. S.; TRAYHURN, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 01, p. 3-9, 2003.

WOODSIDE, B.; POPESKI, N. The contribution of changes in milk delivery to the prolongation of lactational infertility induced by food restriction or increased litter size. **Physiology & behavior**, v. 65, n. 4, p. 711-715, 1998.

XIAO, J.; YANG, W. Weight loss is still an essential intervention in obesity and its complications: a review. **Journal of obesity**, v. 2012, 2012.

XIAO, X. Q. et al. Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis. **Endocrinology**, v. 148, n. 9, p. 4150-4159, 2007.

YAJNIK, C. S. Fetal programming of diabetes: still so much to learn! **Diabetes care**, v. 33, n. 5, p. 1146-1148, 2010.

YAJNIK, C. S.; DESHMUKH, U. S. Fetal programming: Maternal nutrition and role of one-carbon metabolism. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 13, n. 2, p. 121-127, 2012.

ZAGOORY-SHARON, O. et al. Adaptation to lactation in OLETF rats lacking CCK-1 receptors: body weight, fat tissues, leptin and oxytocin. **International journal of obesity**, v. 32, n. 8, p. 1211-1221, 2008.

ZAIA, D. A.; ZAIA, C.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZHAO, F.-Q.; KEATING, A. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. **Journal of Dairy science**, v. 90, p. E76-E86, 2007.

ZHAO, Z.-J.; CHI, Q.-S.; CAO, J. Milk energy output during peak lactation in shaved Swiss mice. **Physiology & behavior**, v. 101, n. 1, p. 59-66, 2010.

9 ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 16/2012

Protocolo UEPG – 03482/2012

**Título – “O exercício físico e o controle secretor de insulina na obesidade induzida por
marcação metabólica”.**

Interessado – Dra Sabrina Grassioli

Data de Entrada – 21/03/2012

Resultado: Aprovado

**Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
11/05/2014**

Considerações

Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 80 ratos Wistar.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no
momento da apresentação de um novo protocolo.**

Professor Dr. Giovani Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

fl 13



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 17/2012

Protocolo UEPG – 03482/2012

Título – “O efeito da espienectomia sobre a obesidade induzida por glutamato monossódico”.

Interessado – Dra Sabrina Grassioli

Data de Entrada – 21/03/2012

Resultado: Aprovado

**Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
11/05/2014**

Considerações

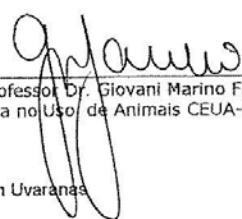
Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 80 ratos Wistar.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.

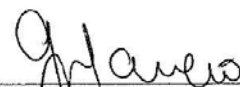

Professor Dr. Giovani Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria, anexo a PROPEP
Fone: (042) 3220-3264

H14

UEPG

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL****CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 18/2012****Protocolo UEPG – 03482/2012****Título – “Efeito do GLP-1 em linhas isoladas de ratos obesos”.****interessado – Dra Sabrina Grassioli****Data de Entrada – 21/03/2012****Resultado: Aprovado****Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
11/05/2014****Considerações****Prezado Professor,****Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:****- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 80 ratos Wistar.****Atenciosamente,****Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.****Professor Dr. Giovani Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG****Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria – anexo a PROPESP
Fone: (41) 3220-3264**