

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ÁREA DE FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

JOÃO LUCAS DE PAULA XAVIER

IMPACTO DA REDUÇÃO DE NINHADA DURANTE O PERÍODO LACTACIONAL
SOBRE A MORFOFISIOLOGIA MATERNA E SUA REPERCUSSÃO NA PROLE

PONTA GROSSA
2016

JOÃO LUCAS DE PAULA XAVIER

IMPACTO DA REDUÇÃO DE NINHADA DURANTE O PERÍODO LACTACIONAL
SOBRE A MORFOFISIOLOGIA MATERNA E SUA REPERCUSSÃO NA PROLE

Dissertação de mestrado apresentada para obtenção
do título de Mestre em Ciências Biomédicas pela
Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de
Fisiologia e Fisiopatologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sabrina Grassioli.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Dionizia Xavier Scomparin.

PONTA GROSSA

2016

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

X3 Xavier, João Lucas de Paula
 Impacto da redução de ninhada durante o
 período lactacional sobre a
 morfofisiologia materna e sua repercussão
 na prole/ João Lucas de Paula Xavier.
 Ponta Grossa, 2016.
 77f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
 Biomédicas - Área de Concentração:
 Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade
 Estadual de Ponta Grossa.

 Orientadora: Prof^a Dr^a Sabrina
 Grassiolli.

 Coorientadora: Prof^a Dr^a Dionizia
 Xavier Scomparin.

 1.Lactação. 2.Programação metabólica.
 3.Mães. 4.Prole. I.Grassiolli, Sabrina.
 II. Scomparin, Dionizia Xavier. III.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Mestrado em Ciências Biomédicas. IV. T.

CDD: 616.39



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISILOGIA E FISIOPATOLOGIA, NÚMERO DA ATA 05/2016, DO MESTRANDO JOÃO LUCAS DE PAULA XAVIER REALIZADO NO DIA 04 DE MARÇO DE 2016, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos quatro dias de março de dois mil e dezesseis, às 14h00min na sala 93-A, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da **Professora Dra. Sabrina Grassioli** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas do mestrando **João Lucas de Paula Xavier** na linha de pesquisa; Fisiopatologia do metabolismo e do sistema imune, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professora Dra. Carla Cristine Kanunfre (UEPG/PR)** e **Professor Dr. Júlio Cezar de Oliveira (UFMT/MT)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **O impacto da redução de ninhada durante o período lactacional sobre a morfofisiologia materna e sua repercussão na prole**. Encerrado a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como APROVADO considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. O aluno deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☒ não ☐

Novo título: IMPACTO DA REDUÇÃO DE NINHADA DURANTE O PERÍODO LACTACIONAL SOBRE A MORFOFISIOLOGIA MATERNA E SUA REPERCUSSÃO NA PROLE

Sabrina Grassioli 1- (UNIOESTE) - Presidente

Carla Cristine Kanunfre 2- (DEBIO - UEPG) - Titular

Júlio Cezar de Oliveira 3- (UFMT) - Titular

Ponta Grossa, 04 de Março de 2016.

Dedico à minha mãe, Matilde Zepiela Xavier.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter abençoado a minha vida em todos os momentos.

Aos meus pais, que me ajudaram a estar aqui, pela educação que tenho e à vida!

Às minhas professoras orientadoras, Sabrina Grassioli e Dionizia Scomparin, pela aceitação e comprometimento comigo e com o meu trabalho.

Aos meus colegas e amigos de iniciação científica, Catherine Copas Pontes, Paulo Roberto Ribeiro, Maiara Mikuska Cordeiro, Jessica Amanda Marcondes, Felipe Oliveira Mendonça e Makcine Tim da Silva, que tanto contribuíram com este trabalho.

Aos professores do programa, que de alguma forma me ajudaram no decorrer do mestrado.

À minha amiga Vanessa Barbosa, pela consideração, incentivo e ajuda em todos os momentos.

Às minhas professoras da graduação, Yvanna Salgado, Vânia Martins, Milene Vosgerau e Juliane Swiech que me estimularam a fazer mestrado.

Às técnicas do biotério, Marilene e Maria, pelo auxílio com os animais.

À Thayanne, pela inspiração, força e incentivo na reta final do mestrado.

Ao meu grande amigo Edmilson, pelo auxílio técnico em informática.

A todos que de alguma forma fizeram com que o projeto se concretizasse.

Só o conhecimento garante o seu futuro!

RESUMO

A programação metabólica é um fenômeno desencadeado por alterações nutricionais e/ou hormonais que ocorrem em fases críticas do desenvolvimento, como a lactação, podendo promover mudanças metabólicas e funcionais que determinam a maior predisposição a estados patológicos na vida adulta. O trabalho teve como objetivo caracterizar o efeito da manipulação do número de filhotes da ninhada sobre os parâmetros biométricos, metabólicos e histológicos maternos e sua repercussão sobre a prole em diferentes fases da lactação. No 3º dia após o nascimento o número de filhotes da prole foi ajustado em Ninhada Normal (NN), 9 filhotes e Ninhada Reduzida (NR), 3 filhotes. As Mães-NN e Mães-NR, bem como, os Filhotes-NN e Filhotes-NR foram estudados ao 7º, 14º e 21º dia de lactação avaliando o perfil metabólico, composição corporal e aspectos histológicos. Os resultados demonstraram diminuição de consumo alimentar das Mães-NR, maior estoque de gordura retroperitoneal e menor depósito de gordura no tecido adiposo marrom (TAM). A glândula mamária apresentou menor grau de desenvolvimento alveolar, com aumento da adiposidade, resultando em leite com maior teor calórico. Mães-NR também apresentaram redução no tamanho de ilhotas pancreáticas, redução de peso do fígado, com aumento da glicemia. Filhotes-NR apresentaram maior peso corporal, obesidade, acompanhada de aumento do TAM e indícios de menor atividade termogênica. Adicionalmente estes animais apresentaram menor peso cerebral e adrenal durante a progressão da lactação. Filhotes-NR também apresentaram elevação da glicemia e proteinemia. Deste modo, o estudo confirmou que a redução de ninhada durante o período lactacional promove alterações morfofisiológicas materna com repercussões sobre o peso corporal e metabolismo da prole, eventos que podem ser marcadores de programação e suas complicações ao longo da vida.

Palavras-chave: Lactação. Programação metabólica. Mães. Prole.

ABSTRACT

Metabolic programming is a phenomenon triggered by nutritional and/ or hormonal changes that occur at critical stages of development, such as lactation and may promote metabolic and functional changes that determine the greater predisposition to pathological conditions in adulthood, as obesity and DM2. The work aims to characterize the effect of reducing the number of offspring pups on the biometric parameters, metabolic and histological maternal and offspring at different stages of lactation. On the 3rd day after birth the number of offspring pups was adjusted Normal Litter (NL), and 9 puppies Reduced Litter (RL), 3 puppies. Mothers and Mothers-NL-RL and the puppies and puppies-NL-RL were studied after 7, 14 and 21 day lactation evaluating the metabolic profile, body composition and histological aspects. The results demonstrated decreased food intake Mother-RL in 3 stages of lactation, higher stock of retroperitoneal fat and increased thermogenic activation in brown adipose tissue (BAT). The mammary gland presented a lower degree of alveolar development with increased adiposity, resulting in milk with higher calorie content. Mothers-RL also show a reduction in the size of pancreatic islets, liver weight reduction with increased blood glucose levels. Puppies-RL had higher body weight, obesity, accompanied by increase in BAT and indications of lower thermogenic activity in this sector. Additionally these animals showed less brain and adrenal weight during the progression of lactation. Puppies-RL also have elevated blood glucose and serum protein. Thus, the study confirms that litter reduction during the lactation period promotes maternal morphophysiological changes with effects on body weight and metabolism of offspring, events that can be programming markers and its complications throughout life.

Keywords: Lactation. Metabolic programming. Mothers. Offspring.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	PROGRAMAÇÃO METABÓLICA	10
2.2	LEITE E LACTAÇÃO	13
2.2.1	Composição do Leite	13
2.2.2	Glândula Mamária	14
2.2.3	Adaptações e Condições Maternas	15
2.2.4	Desenvolvimento da prole na lactação	19
2.3	OBESIDADE	20
2.3.1	Síndrome Metabólica	20
2.4	TECIDO ADIPOSEO	22
2.4.1	Tecido Adiposo Branco (TAB)	22
2.4.2	Tecido Adiposo Marrom (TAM)	23
2.5	MODELO DE HIPERNUTRIÇÃO POR REDUÇÃO DE NINHADA	24
2.6	FÍGADO	26
2.7	PÂNCREAS	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	ANIMAIS	30
4.2	AMBIENTE	30
4.3	MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS	30
4.4	MONITORAMENTO DO PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR	31
4.5	COLETA DE LEITE	32
4.6	EUTANÁSIA	32
4.7	COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS E DADOS BIOMÉTRICOS	33
4.8	DOSAGENS SÉRICAS	33
4.9	ANÁLISE DO LEITE	34
4.9.1	Dosagens Bioquímicas	34

4.9.2	Crematócrito	34
4.10	ANÁLISE HISTOLÓGICA	35
4.11	PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	36
4.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
5	RESULTADOS	37
5.1	DADOS DAS MÃES	37
5.2	DADOS DA PROLE	47
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO	77

1 INTRODUÇÃO

O genoma determina o desenvolvimento das características morfológicas e funcionais dos seres vivos. Entretanto, estudos epidemiológicos em humanos assim como, estudos em animais demonstram que a regulação gênica pode ser significativamente modificada por alterações ambientais durante períodos críticos do desenvolvimento, tais como, as fases pré-natal (gestação) e pós-natal (lactação e início da infância). Nestas fases, insultos nutricionais, como variações na quantidade e/ou composição dos nutrientes ou oscilações hormonais promovem marcações no funcionamento do organismo que são refletidas em alterações morfológicas e/ou fisiológicas na vida adulta (GUILLOTEAU et al., 2009). O desenvolvimento ontogenético envolve eventos de plasticidade, permitindo assim que o mesmo genótipo possa gerar variados estados fisiológicos e morfológicos importantes para as adaptações a diferentes condições ambientais (WELLS, 2007; MATHERS; MCKAY, 2009).

Dentro deste contexto, há diversos estudos mostrando que o ambiente sub-ótimo no útero ou durante fases iniciais da vida alteram o desenvolvimento do organismo e predispõe o indivíduo a problemas de saúde ao longo da vida, tais como a Síndrome Metabólica (SM). A SM é caracterizada pela associação de diferentes distúrbios metabólicos e endócrinos, como obesidade, resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertensão arterial e dislipidemias. Elementos que favorecem a instalação precoce do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Esta situação que relaciona períodos críticos do desenvolvimento com a instalação de doenças na vida adulta é denominada programação metabólica, inicialmente chamada de *imprinting* metabólico¹, está diretamente envolvida com as denominadas “Respostas Adaptativas Preditivas” ou “Origens Fetais das Doenças” (HARDER et al., 1999; GUILLOTEAU et al., 2009).

Corroborando com estas hipóteses, diferentes estudos epidemiológicos e experimentais vêm demonstrando que a saúde e o estado nutricional materno durante a gestação e lactação têm efeitos a longo prazo sobre os sistemas centrais e periféricos que regulam o balanço energético de seus descendentes, e deste modo

¹ O termo *imprinting* metabólico foi empregado pela primeira vez por Waterland e Garza (1999) ao se referir aos fenômenos biológicos básicos que supostamente sustentam as relações entre experiências nutricionais do início da vida e doenças posteriores.

modulam o desenvolvimento da prole predispondo a instalação de obesidade e suas comorbidades em particular a DM2 ao longo da vida (SULLIVAN; GROVE, 2010).

A redução do número de filhotes da prole em roedores durante o período lactacional é um modelo experimental bastante utilizado para induzir hipernutrição precoce e investigar sua relação com programação metabólica, bem como, explorar o seu impacto sobre o estado de saúde futuro da prole (HABBOUT et al., 2013). Usando este modelo experimental diferentes estudos confirmam a associação entre a hipernutrição lactacional e a instalação de obesidade, intolerância à glicose, dislipidemia e complicações cardiovasculares na vida adulta. Todavia, a maioria dos estudos exploram os efeitos da programação lactacional e sua repercussão na vida adulta, havendo portanto uma lacuna nos aspectos que tangem os momentos iniciais desta programação, particularmente aqueles dependentes da inter-relação mãe e filho durante o período lactacional.

Deste modo, considerando a lactação uma importante fase do desenvolvimento, vulnerável a eventos de programação metabólica, compreender os eventos precoces que alteram a morfofisiologia materna e sua repercussão para a prole durante as etapas distintas da lactação permite identificar quais os elementos promotores da programação metabólica. Assim, nosso estudo pretendeu caracterizar as alterações de peso corporal, morfologia e metabolismo de mães durante etapas distintas da lactação, bem como, acompanhar a repercussão destes eventos sobre o leite materno e sobre as características metabólicas e morfológicas da prole.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

A programação metabólica é um fenômeno desencadeado por alterações nutricionais e/ou hormonais que ocorrem em fases críticas do desenvolvimento, tais como a gestação e/ou lactação, podendo promover mudanças metabólicas e funcionais que determinam a maior predisposição a estados patológicos na vida adulta, como obesidade e DM2 (WATERLAND; GARZA, 1999).

O desenvolvimento do organismo é caracterizado por fases importantes marcadas por intensas mudanças morfológicas e funcionais, nas quais evidenciam-se aumento da capacidade proliferativa e de diferenciação, com acentuado crescimento. Estes períodos críticos do desenvolvimento são etapas de maior vulnerabilidade dos organismos à programação metabólica, sendo por isso, denominados “janelas de programação”. Insultos hormonais, nutricionais e/ou metabólicos que ocorrem nestas fases tem grande impacto sobre o organismo, promovendo alterações e adaptações a nível celular, tecidual e sistêmico com repercussões para o estado de saúde na vida adulta (GUILLOTEAU et al., 2009; WATERLAND; GARZA, 1999).

Os mamíferos estão em contato com dois ambientes distintos durante o seu desenvolvimento, o ambiente intra-uterino na fase pré-natal, e o extra-uterino durante a lactação e a infância precoce, como fase pós-natal. Nestas etapas do desenvolvimento os organismos podem ser afetados tanto pelas condições metabólicas maternas, quanto pelo ambiente social e nutricional que estão inseridos. Estas condições podem promover a programação de futuras respostas metabólicas da prole ao estímulo que ocorre durante um período crítico do desenvolvimento, como o tipo e quantidade de nutrição disponíveis, sendo cruciais na sobrevivência e sucesso reprodutivo (SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011). Inicialmente o propósito da programação metabólica é permitir a sobrevivência da prole, particularmente em situação de desnutrição intra-uterina, de modo a utilizar os nutrientes disponíveis da forma mais eficiente, priorizando alguns setores, como o caso do Sistema Nervoso Central (SNC) em detrimento a outros sistemas. Todavia, em longo prazo estes ajustes funcionais poderão determinar a predisposição a doenças na vida adulta (SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011).

Diversos mecanismos fisiológicos, metabólicos e hormonais estão envolvidos no processo de programação, entre os quais destacam-se: indução de variações na estrutura de alguns órgãos, com alterações na vascularização, na inervação ou na justaposição das diferentes células do órgão; alterações no número de células e diferenciação metabólica. Em todas estas condições observa-se modificações na expressão gênica, acarretando em variações na síntese de enzimas, hormônios, receptores hormonais e transportadores (WATERLAND; GARZA, 1999). Deste modo a base molecular para explicar a programação

metabólica tem sido, a epigenética. A epigenética compreende mudanças na expressão gênica não relacionadas com alteração de sequência do DNA, dentre os diferentes mecanismos de modificações do DNA envolvidos em programação metabólica, destacam-se as metilações das bases do DNA, bem como, as acetilações de histonas. Estas marcações gênicas parecem fornecer uma “memória” de respostas plásticas aos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento, sendo capazes de promover modificações nos fenótipos que se manifestam ao longo da vida (GOTTLIE et al., 2007; HANLEY et al., 2010; WATERLAND; MICHELS, 2007).

Considerando a programação um fenômeno que modula os mais variados aspectos do desenvolvimento, estudos das últimas décadas confirmam claramente seu papel em diversas condições patológicas. Assim, estudo epidemiológico realizado por Dyer e Rosenfeld (2011) concluíram que a programação metabólica contribui para a etiologia da obesidade, bem como aumento concomitante de doenças crônicas relacionadas ao excesso de tecido adiposo, como o DM2 e as doenças cardiovasculares. Dentro deste contexto, a inter-relação mãe e filho tem um papel evidente, uma vez que a condição materna terá impacto direto sobre os descendentes. Interessantemente, diversos estudos têm demonstrado que situações antagônicas nutricionais, tais como, a desnutrição e a hipernutrição materna aumentam o risco da prole de desenvolver obesidade, doenças metabólicas e cardiovasculares na vida adulta. Atualmente a hipernutrição é a principal causa de alteração metabólica e corporal materna, sendo sobrepeso e obesidade, uma condição que afeta a maioria das mulheres em idade fértil, gerando um risco direto aos seus descendentes (KING, 2006).

A condição metabólica materna e a dieta na gestação e lactação influenciam de forma exponencial o ambiente perinatal, impactando a longo prazo o balanço energético da prole e trazendo o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares (SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011). Segundo Franco e colaboradores (2012), as perturbações observadas no sistema endócrino da prole adulta, como hiperleptinemia e hipertireoidismo são decorrentes das mudanças observadas na composição do leite materno, ofertado durante a lactação. Deste modo, a lactação e seu principal componente, o leite materno tem impacto direto sobre o crescimento e metabolismo do organismo em desenvolvimento, o que exige especial atenção a esta etapa importante do desenvolvimento.

2.2 LEITE E LACTAÇÃO

2.2.1 Composição do Leite

O leite é um líquido corporal complexo, que exerce efeitos muito além do seu valor nutricional, tendo seus componentes um papel direto no desenvolvimento infantil e na condição futura de saúde. Funcionalmente, diferentes hormônios coordenam o desenvolvimento da glândula mamária e a lactagênese, incluindo os ajustes entre o desenvolvimento reprodutivo e as necessidades da prole (NEVILLE, 2012; NEVILLE; MCFADDEN; FORSYTH, 2007).

A nível nutricional o leite materno é composto de lipídeos, carboidratos e proteínas. Em roedores as proteínas representam cerca de 12% da composição do leite, compreendendo a caseína, a lactoalbumina, a lactoferrina e as imunoglobulinas. A lactose e a glicose são os carboidratos encontrados no leite, sendo que a lactose tem uma concentração muito maior, representando 5% do total do leite. Os lipídeos representam 30%, sendo a principal fonte de energia, cerca de 50% do valor calórico total. A principal categoria de lipídeo encontrada no leite são os triglicerídeos, representando cerca de 98% (ASSUMPÇÃO et al., 2004).

A lactação é a situação nutricional mais precoce do recém-nascido, dando continuidade à nutrição iniciada na vida intra-uterina. O leite materno contém hormônios e fatores do crescimento que atuarão no crescimento, diferenciação e maturação funcional de órgãos específicos, afetando o desenvolvimento da prole (WAGNER, 2002; HIRAI et al., 2002; HAMOSH, 2001). A composição do leite materno pode estar envolvida no processo de programação metabólica, causando alterações no número e/ou tamanho dos adipócitos e induzindo o fenômeno de diferenciação metabólica. A complexidade da rede neuroendócrina que regula o balanço energético, devido aos seus inúmeros componentes e aos fatores bioativos no leite sugere uma infinidade de potenciais mecanismos de atuação do leite materno neste processo (BALABAN; SILVA, 2004).

Em estado homeostático, as concentrações dos componentes do leite são ideais às necessidades dos lactentes. Todavia, diversos fatores podem influenciar na composição e/ou volume da secreção de leite, principalmente os fatores genéticos, a reposição hídrica materna, além de modulações que ocorrem em

diferentes etapas da lactação dos roedores (ANDERSON et al., 2007; RUDOLPH et al., 2007). A constituição do leite materno pode estar envolvida em eventos de programação metabólica, sendo que a composição pode sofrer alteração de acordo com o número de filhotes da prole, ocasionando também consequentemente alterações teciduais na glândula mamária.

2.2.2 Glândula Mamária

A Glândula Mamária (GM) é um órgão que sintetiza e secreta leite, constituída de tecido adiposo e tecido glandular, região do parênquima; de tecido conjuntivo, que compreende o estroma (BRAGULLA; KÖNIG, 2004; NEVILLE, 2001; BRAGULLA; KÖNIG, 2004). O parênquima alveolar é uma porção de células epiteliais que sintetizam alguns componentes do leite e captam outros do plasma. Os alvéolos mamários drenam o leite para ductos que se unem a ductos maiores até abrir em uma cisterna ou no exterior do mamilo (BRAGULLA; KÖNIG, 2004). Estes alvéolos são agrupados em unidades, lóbulos, cada um deles envolvido por um septo distinto de tecido conjuntivo, sendo agrupados em unidades maiores, os lobos. Os alvéolos são recobertos por células mioepiteliais contráteis e respondem ao reflexo de ejeção do leite (BRAGULLA; KÖNIG, 2004; BARTOL et al., 2013). Os ductos galactóforos próximos ao mamilo 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 (LEITE et al., 2007).

Nos períodos de gravidez e lactação o depósito de tecido adiposo subcutâneo se modifica, com diminuição de tecido adiposo e importante desenvolvimento dos componentes da glândula epitelial secretora de leite lóbulo-alveolar. Após o fim da lactação, os componentes glandulares diminuem e uma rápida e grande adipogênese restaura o tecido adiposo mamário (MASSO-WELCH et al., 2000). Assim como explica Cinti (2009), que os achados morfológicos sugerem um processo de transdiferenciação que converte os adipócitos em células do epitélio alveolar e posteriormente reverte este epitélio em adipócitos durante a involução mamária.

Durante a gravidez os adipócitos da glândula mamária supostamente podem

se transformar em células epiteliais, acrescentando a parte lóbulo-alveolar que sintetiza leite. Ao final da lactação o componente lóbulo-alveolar regride e os adipócitos retornam como em situações anteriores a gestação e lactação (SMORLESI et al., 2012).

A constituição morfológica da GM pode ser modulada pela condição materna. Neste sentido, estudos demonstram que a dieta hiperlipídica em lactantes promove aumento no número e tamanho de adipócitos na glândula mamária, diminuição dos lumens alveolares, alvéolos irregulares e com expressão de enzimas e receptores que regulam a involução da glândula aumentados, sugerindo que a produção e/ou composição do leite pode ser afetado nesta condição (HERNANDEZ et al., 2012).

Adicionalmente, outros fatores afetam a secreção do leite, entre os quais destaca-se a frequência da amamentação. A retirada regular de leite da glândula mamária é essencial para manter a secreção de leite. Estudos realizados em roedores demonstraram que as mudanças na frequência de ordenha influenciava o fluxo sanguíneo mamário, o número de células mamárias e sua atividade. Evidenciou-se também que o aumento da frequência de ordenha durante o início da lactação estimula o aumento da produção de leite que parcialmente persiste até o final da lactação, indicando os efeitos a longo prazo sobre a função mamária (WALL; MCFADDEN, 2012).

Deste modo, durante a lactação o leite é o vínculo nutricional entre mãe e filho e fornece um meio pelo qual eventos de programação podem ocorrer na prole. Neste sentido, o estado fisiológico materno pode ser importante condição relacionada à composição e volume do leite.

2.2.3 Adaptações e Condições Maternas

Considerando o leite um produto complexo, cujo volume e composição são diretamente afetados pela condição metabólica, hormonal e nutricional materna sua produção exige ajustes fisiológicos e teciduais maternos. Em particular durante a lactação observa-se mudanças na relação de tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM) nas lactantes. Os adipócitos brancos armazenam energia, ao passo que os adipócitos marrons dissipam energia para a termogênese. Os ajustes

funcionais destes dois depósitos de tecido adiposo materno, são fundamentais para manter a produção de leite durante a lactação (SMORLESI et al., 2012).

A importância da lactação e da dieta materna sobre o metabolismo da prole podem ser observados em estudos de Sullivan (2012). Neste trabalho os autores demonstram que o consumo aumentado de lipídeos na dieta materna durante a gestação e lactação dos roedores pode alterar o leite, resultando num aumento dos níveis de lactose, triglicerídeos e proteínas. Consequentemente, os filhotes foram expostos a uma hipernutrição pós-natal precoce que promoveu aumento no peso corporal e adiposidade no momento do desmame. Adicionalmente, acompanhando a adiposidade, a prole pode apresentar hiperglicemia, hiperleptinemia e sinais de resistência à leptina no núcleo arqueado do hipotálamo, o que pode contribuir para a hiperfagia. Similares achados confirmados em outros estudos durante a lactação, mostrando que a dieta materna influencia a regulação do sistema endócrino, a homeostase energética, a reprodução e mecanismos comportamentais, tais como respostas ao estresse, da prole (SULLIVAN, 2012). Deste modo, o período lactacional é considerado uma janela crítica do desenvolvimento que torna o indivíduo mais suscetível a insultos nutricionais, em especial a alterações na composição e/ou volume do leite materno terão impacto e repercussões na prole.

Adicionalmente, além dos nutrientes, importantes hormônios reguladores do peso corporal podem atingir o lactente via leite. Por exemplo, mães diabéticas apresentam aumento dos níveis de insulina no leite, um importante hormônio programador no período da lactação, em especial para a obesidade e suas comorbidades (SULLIVAN; GROVE, 2010, p. 4 apud PLAGEMANN et al., 2002).

A composição corporal materna é modificada durante a lactação, modificando particularmente a distribuição do tecido adiposo. Em pequenos mamíferos observa-se intensa redução de suas reservas de gordura para níveis baixíssimos durante este período. A diminuição do tecido adiposo induz a redução de adipocinas, como a leptina, o que poderia ter um papel na estimulação da hiperfagia durante a lactação (CUI et al., 2011).

Assim, frequentemente animais lactantes consomem maiores quantidades de alimento que os animais não-lactantes, mas o consumo de energia parece ser limitado na fase tardia da lactação. A teoria do limite de dissipação de calor sugere que a ingestão de alimentos durante o período lactacional é limitada pela

capacidade da mãe em dissipar o calor, um ajuste que envolve a supressão da termogênese no TAM (GAMO et al., 2013). A termogênese do TAM diminui na lactação, reduzindo o gasto energético a fim de poupar para a produção de leite. Em humanos, os estoques de TAM não sofrem alterações significativas na lactação, porém a lipogênese no tecido está diminuída (PEDRAZA et al., 2000). Os efeitos da termogênese sobre a lactogênese também tem sido observados por Król, Johnson e Speakman (2003) em ratos, estes autores mostraram que a capacidade de produção de leite não está limitada a atividade das glândulas mamárias, mas a capacidade do animal em dissipar o calor gerado pelo corpo como subproduto do processamento de alimentos e produção de leite.

Adicionalmente, a produção de leite é um processo regulado endocrinamente, tendo a prolactina uma ação central neste processo, visto que é um modulador da função dos adipócitos com impacto sobre a homeostase energética, além de afetar a termogênese adaptativa. A prolactina também pode interagir em conjunto com outros fatores para alterar a atividade metabólica dos tecidos-alvo, sendo que em roedores a prolactina também tem um papel central nos ajustes fisiológicos necessários a lactação, neste sentido, estudos em modelos animais fornecem uma grande oportunidade para examinar as interações entre prolactina e hormônios como insulina, glicocorticóides e catecolaminas que afetam o metabolismo de glicose, a lipogênese, a lipólise e a liberação de adipocinas (CARRÉ; BINART, 2014). Estudo realizado por Vernon e Flint (1983) mostra que a lactação não resulta somente do aumento da taxa de síntese de ácidos graxos na glândula mamária, mas também na diminuição da taxa de síntese dos ácidos graxos nos tecido adiposo, e em ratos, um aumento da taxa de síntese de ácidos graxos hepática. Segundo os autores a progesterona e a prolactina podem influenciar a taxa de síntese dos ácidos graxos através da modulação da capacidade de ligação de insulina nos tecidos, sendo evidente que o mecanismo de ação da insulina subsequente a sua ligação ao receptor também seja alterada no tecido adiposo durante a lactação.

Deste modo, fica evidente que as condições e hábitos alimentares maternos também interferem com a composição do leite, como mostra estudo realizado por Franco e colaboradores (2012). Neste estudo os autores verificaram que a dieta hiperlipídica materna muda a composição do leite, resultando em obesidade e

hiperglicemia nos filhotes machos já ao desmame, com 21 dias de vida. A obesidade está associada à hiperleptinemia e à alterações centrais da via de sinalização de leptina no núcleo arqueado do hipotálamo; que há aumento das catecolaminas adrenais na prole, com redução de adrenoreceptores hepáticos e no tecido adiposo, contribuindo assim para o aumento da adiposidade nesses animais. A obesidade precoce e a hiperleptinemia na prole pode ter um efeito estimulante sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide como uma resposta adaptativa ao balanço energético positivo e que isso, com o aumento das catecolaminas e hormônios tireoidianos, pode afetar a função cardiovascular pelo desenvolvimento da hipertensão arterial. Por outro lado, ratas lactantes submetidas a jejum de 12 horas apresentam uma queda na taxa de produção de leite e síntese de ácidos graxos na glândula mamária (VERNON; FLINT, 1983, p. 321 apud ROMSOS et al., 1978).

Adicionalmente, características da prole como tamanho, crescimento e número de animais afetam produção e composição do leite. Deste modo, a produção de leite e a ingestão de alimentos são regulados para coincidir com a capacidade limitada de crescimento da prole. As diferenças nos níveis observados de produção de leite em diferentes condições pode refletir em uma complexa interação entre fatores limitantes do desempenho materno, como: a dissipação de calor e os fatores que influenciam o crescimento máximo do filhote, como o tamanho e a temperatura da ninhada, sendo ideal quanto maior for a temperatura (ZHAO et al., 2013).

O estudo de Morag, Popliker e Yagil (1975) confirmou a teoria de que a lactação é regulada em parte pela intensidade do estímulo de aleitamento, sendo evidente também que o tamanho da ninhada afeta tanto a secreção quanto a remoção de leite. O rendimento de leite das ratas pode ser estimado pela pesagem da ninhada, antes e depois de amamentadas (MORAG; POPLIKER; YAGIL, 1975, p. 43 apud WEIHE, 1968).

Como discutido anteriormente, a composição do leite pode estar relacionada à programação metabólica, de forma que esta possa gerar consequências na prole durante o desenvolvimento e assim se repercutir para o estado de saúde dos descendentes na vida adulta.

2.2.4 Desenvolvimento da prole na lactação

Nos mamíferos em geral, durante a fase pós-natal precoce, a qual inclui a lactação, ocorre desenvolvimento e remodelação de alguns órgãos, tornando os tecidos mais susceptíveis a eventos de programação metabólica. Neste sentido, um órgão bastante vulnerável é o pâncreas endócrino, visto que a maturação das ilhotas pode ocorrer durante a lactação, as quais ficam factíveis a modificações pela programação metabólica (PATEL; SRINIVASAN, 2011).

Outro tecido que sofre remodelação durante a lactação é o tecido neural, visto que, o SNC apresenta nesta fase continuação da maturação encefálica, com modulações no número de sinapses, tropismo de células neuronais, apoptose e crescimento axonal (LEVIN, 2000b). Os efeitos variam de acordo com o tempo de exposição, a quantidade e precocidade da hipernutrição, na qual a alimentação tem ação fundamental na maturação funcional encefálica (WATERLAND; GARZA, 1999). Deste modo, a amamentação desempenha papel crucial na modulação e desenvolvimento das redes neurais do recém-nascido. O leite não é só fundamental para a proteção e nutrição do recém-nascido, mas também possui relevância devido aos seus componentes interferirem na homeostase energética ao longo de toda a vida (NEVILLE et al., 2012).

Assim, particularmente em situações de desnutrição, o desenvolvimento do SNC é priorizado em relação a outros órgãos, desta forma, o crescimento encefálico é preservado, comprometendo o desenvolvimento de outros órgãos, como o fígado, os músculos, rins e pâncreas (COTTRELL; OZANNE, 2007; GRINO, 2005).

Dentre as diferentes regiões neurais vulneráveis à programação durante o período lactacional destaca-se o hipotálamo. Esta região é muito propensa a remodelação por sensibilização hormonal, como pela leptina no período pós-natal e outros mediadores, alguns presentes no leite materno. A diferenciação dos núcleos hipotalâmicos da prole pode sofrer alterações por fatores externos durante a gestação e após o nascimento, ocasionando distúrbios metabólicos e nutricionais futuros, incluindo hiperfagia e hiperinsulinemia (BOURET, 2009; GROVE et al., 2005; TAYLOR; POSTON, 2007).

Em conjunto os resultados acima descritos, claramente demonstram a importância do período lactacional para a completa maturação e adequado

funcionamento dos sistemas da prole, um processo que pode ser afetado pela composição e volume do leite materno.

2.3 OBESIDADE

A obesidade é uma doença crônica que se instala lentamente no organismo, resultando um balanço energético positivo, o qual excede a necessidade energética, resultando em um aumento do peso corporal, particularmente pela expressão do tecido adiposo branco (TAB) (MARTINEZ, 2000; TAYLOR; POSTON, 2007). Deste modo, a obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo visceral, associado a desordens metabólicas e neurais, que culminam com alterações funcionais entre pâncreas, fígado, músculo esquelético, tecido adiposo, intestino e cérebro e o rompimento da homeostase glicêmica e lipídica (FONSECA-ALANIZ et al., 2007; FRÜHBECK, 2008). A obesidade é considerada uma epidemia mundial, aumentando o risco de desenvolvimento das doenças cardiovasculares em indivíduos de todas as faixas etárias e níveis sociais (FARMER, 2008).

Considerando que sobrepeso e obesidade são condições frequentes em mulheres apresentam elevado ganho de peso durante a gestação, sugerindo que o excesso de tecido adiposo é persistente durante o período lactacional. Adicionalmente, alterações do peso corporal materno nestes períodos são acompanhadas de diabetes, hipertensão e dislipidemia que podem ter claro papel na programação metabólica. Assim, estudos epidemiológicos sugerem que a desnutrição materna, obesidade e diabetes durante a gestação e lactação podem ocasionar obesidade na prole (LEVIN, 2006). Neste sentido, a manipulação do número de filhotes da ninhada durante a lactação pode gerar um processo de programação, uma vez que afeta o metabolismo materno, modificando o leite e ocasionando a instalação de obesidade e suas comorbidades, como a Síndrome Metabólica na prole.

2.3.1 Síndrome Metabólica

A Síndrome Metabólica (SM) é uma condição fisiopatológica em que o excesso de TAB, caracterizando a obesidade, gera distúrbios metabólicos e

endócrinos, como a resistência à insulina e intolerância a glicose, clinicamente observadas pela hiperinsulinemia e hiperglicemia de jejum, quadro que estabelece o DM2; hiperleptinemia; dislipidemia, distúrbio das concentrações plasmáticas de lipídeos; e hipertensão arterial sistêmica, aumentando o risco de doenças cardiovasculares (COTTREL; OZANNE, 2007; CORNIER et al., 2008; KITZINGER; KARLE, 2013).

O excesso de TAB gera um grande aumento de síntese e secreção de adipocinas, as quais agem de forma patológica a desencadear as desordens que caracterizam a SM, com estado pró-inflamatório crônico (JIALAL, 2013). O excesso de ácidos graxos livres oriundos do estado inflamatório e da apoptose dos adipócitos hipertróficos é também um fator desencadeante da SM (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). Podem ocorrer deposição ectópica de triglicerídeos nos músculos, fígado e pâncreas, evento envolvido em resistência à insulina periférica (BASTARD et al., 2006).

A SM pode também ser consequência da programação fetal. Conforme demonstram estudos, desordens metabólicas ou hormonais no período gestacional, como o diabetes gestacional, o sobrepeso materno, mudanças alimentares da mãe e alterações hormonais maternas afetam a condição ao nascimento, bem como, favorecem a instalação de SM na vida adulta (LEVIN, 2006). Deste modo, a prole de mães que sofreram estas desordens na gestação possuem tendência de excesso de gordura, já a partir do nascimento, sendo que a adipogênese precoce iniciada na fase pré-natal tem um grande potencial de crescimento (BARKER, 2007; TAYLOR; POSTON, 2007). Adicionalmente, no período embrionário, elevações ou reduções na concentração de vários hormônios, assim como a situação nutricional materna influenciam na formação do eixo hipotálamo-hipófise (BATESON et al., 2004; ACHARD et al., 2006). Estas mudanças podem influenciar na ação de hormônios, como a insulina e o hormônio do crescimento que estão ligados ao desenvolvimento da SM e DM2 na prole (LEVIN, 2000a). Interessantemente, similares mecanismos de programação também podem ocorrer durante a lactação, alterando a composição e volume do leite, culminando com o rompimento da homeostase energética e favorecendo a instalação de obesidade, SM e DM2 na vida adulta.

2.4 TECIDO ADIPOSEO

2.4.1 Tecido Adiposo Branco (TAB)

O TAB é formado por adipócitos brancos cuja principal função metabólica é a síntese e armazenamento de lipídeos, primariamente na forma de triglicerídeos. Nestas células os lipídeos armazenados intracelularmente ficam reunidos em uma única vesícula no citoplasma. O TAB está distribuído em diferentes regiões do organismo, sendo mais evidente os depósitos subcutâneos e o abdominal ou visceral. Na obesidade a deposição de gordura nos diferentes depósitos é desproporcional, frequentemente ocorre maior deposição de gordura na região abdominal ou visceral, processo mais intimamente ligado a estados patológicos, como SM e DM2 (MOURA; MONTEIRO, 2010; WAJCHENBERG, 2000; YANG; SMITH, 2007).

A expansão do TAB na obesidade pode ocorrer pelo aumento do volume dos adipócitos (hipertrofia) e pelo aumento do número de células adiposas (hiperplasia). Essa condição é determinada por vias diferentes, de lipogênese e adipogênese, respectivamente, sendo a hipertrofia mais prejudicial, pois nesse caso os adipócitos sintetizam e secretam quantidades maiores de citocinas inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α , da sigla no inglês), a Interleucina-1 (IL-1) e Interleucina-6 (IL-6), gerando processos inflamatórios locais e sistêmicos (YANG; SMITH, 2007; QUEIROZ et al., 2009; RAMALHO; GUIMARÃES, 2008).

O TAB é um depósito energético corporal, mas também um importante órgão endócrino-metabólico que age no metabolismo energético, o qual recebe sinalizações neuroendócrinas, autócrinas e parácrinas, sintetiza e secreta moléculas mediadoras que atuam em regiões hipotalâmicas envolvidas na regulação da ingestão alimentar, estoque energético e saciedade (BOGUSZEWSKI; PAZ-FILHO; VELLOSO, 2010; LEITE; NETO, 2009).

Os sinalizadores sintetizados e secretados pelos adipócitos são chamados de adipocinas, podendo ser hormônios peptídicos e citocinas que exercem efeitos metabólicos e endócrinos no SNC, músculo e fígado no controle da ingestão alimentar, sensibilidade à insulina, angiogênese, regulação da pressão arterial e da coagulação sanguínea (LEITE; NETO, 2009; YANG; SMITH, 2007; HAVEL, 2004).

Dentre as diferentes substâncias liberadas pelos adipócitos destaca-se a leptina, um hormônio peptídico que tem como principal ação, regular a ingestão alimentar por sinalizações no hipotálamo. No período gestacional a leptina pode interferir em funções neuroendócrinas, na resistência à insulina e no metabolismo energético da prole. O hipotálamo é susceptível às intervenções hormonais durante o período neonatal, como pela leptina que pode atuar na reorganização dos circuitos neuronais, atuando também em outros eventos posteriores, como a puberdade (SAGAWA et al., 2002; WILLIAMS et al., 2002; BOURET, 2009).

2.4.2 Tecido Adiposo Marrom (TAM)

O TAM é constituído de adipócitos marrons que também armazenam lipídeos na forma de triglicerídeos, todavia neste tecido os estoques de lipídeos estão armazenados em vesículas dispersas no citoplasma (LEITNER; BARTNESS, 2009). O TAM destaca-se por sua ação termogênica, ou seja, de produção de calor, um processo mediado pelo Sistema Nervoso Simpático (SNS) (YOSHIOKA; YOSHIDA; KONDO, 1991).

A função de termogênese e termorregulação está ligada a grande quantidade de mitocôndrias, em cujas cristas mitocondriais ocorre a presença da proteína desacopladora-1 (UCP-1). Esta proteína de membrana mitocondrial atua como canal de vazamento de prótons, desacoplando o gradiente de prótons, gerando uma cadeia transportadora de elétrons no espaço intermembrana, reduzindo a síntese de Trifosfato de adenosina (ATP) e permitindo a dissipação da energia em forma de calor. Assim, esta proteína concede a utilização da energia proveniente da oxidação de ácidos graxos para a geração de calor para a célula (LEITNER; BARTNESS, 2009; CINTI, 2009). Particularmente em roedores o TAM exerce um papel importante no metabolismo energético, uma vez que permanece ativo ao longo da vida. Estudos tem demonstrado que a superexpressão desta proteína no TAM previne a obesidade em ratos, adicionalmente, ratos obesos apresentam redução na termogênese no TAM, acompanhada de desenvolvimento de hiperfagia nestes animais (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Interessantemente roedores oriundos de ninhadas reduzidas durante a lactação também apresentam redução na termogênese no TAM, supostamente pela condição de diminuição de

fluxo simpático, caracterizado por menor número de receptores β -adrenérgicos, reduzidas inervações noradrenérgicas, refletindo em menor estímulo à lipólise e aumentado a susceptibilidade destes à obesidade (HABBOUT et al., 2013; XIAO et al., 2007).

Atualmente diferentes evidências indicam que pode ocorrer um processo de transdiferenciação entre TAM e TAB e vice-versa. Essa conversão entre os tecidos poderia ser mais acentuada em determinadas condições, tais como situações de diferenças térmicas, gravidez, lactação, obesidade, jejum prolongado, entre outras (CINTI, 2009; SMORLESI et al., 2012).

O TAM pode ter atuação importante na prevenção da obesidade. Estudos sugerem que o conteúdo e a função desse tecido preditem um quadro de obesidade pelo fato do TAM consumir energia na produção de calor e estar presente em humanos adultos, por conta disto, criou-se a expectativa do emprego do TAM como um tecido contra a obesidade (CYPESS et al., 2010; SMORLESI et al., 2012).

2.5 MODELO DE HIPERNUTRIÇÃO POR REDUÇÃO DE NINHADA

O modelo de redução de ninhada em ratos para hipernutrição precoce foi estabelecido por Kennedy (1957). Estudos posteriores demonstraram que a redução pós-natal do tamanho da ninhada produzia aumento significativo na ingestão alimentar na vida adulta, devido à maior disponibilidade de leite materno no período crítico pós-natal imediato (DÖRNER; PLAGEMANN, 1994; HEIDEL; PLAGEMANN; DAVIDOWA, 1999; PLAGEMANN et al. 1999a; PLAGEMANN et al., 1999b).

O modelo de ninhada reduzida (NR) consiste em reduzir o tamanho da ninhada ao número de 3 filhotes durante a lactação, uma vez que, ratos e camundongos tem aproximadamente dez filhotes por gestação. Este modelo tem sido amplamente empregado devido ao baixo custo e grande efetividade para o desenvolvimento do sobrepeso e obesidade da prole ao longo do desenvolvimento (HOTAMISLIGIL, 2006; RODRIGUES et al., 2007).

A redução de ninhada durante o período lactacional fornece maior disponibilidade de leite materno aos filhotes, com a maior oferta de leite os filhotes ingerem o volume máximo da capacidade do trato gastrointestinal. Esta ingestão exagerada pode levar o animal a hipernutrição, visto que o controle hipotalâmico no

início da vida pós-natal ainda não está completamente estruturado. Portanto, a indução da hipernutrição precoce tem sido relacionada a instalação de excesso de peso e hiperfagia na vida adulta promovendo programação metabólica, particularmente hipotalâmica, tornando o animal hiperfágico e favorecendo a instalação de obesidade na vida adulta (MCMILLEN; ADAM; MUHLHAUSLER, 2005; HOUPY; EPSTEIN, 1973; POZZO MILLER; AOKI, 1992). Deste modo, a manipulação do número de filhotes durante a lactação modula o volume e a composição do leite materno, afetando a prole e tendo repercussões para o metabolismo futuro.

A criação de roedores em ninhadas reduzidas é um modelo experimental útil para o estudo da hipernutrição precoce, o qual permite verificar a curto e longo prazo as modificações do peso corporal, ingestão de alimentos e dos aspectos bioquímicos e metabólicos, como hiperglicemia, hiperinsulinemia com resistência à insulina e alterações em estruturas hipotalâmicas de controle alimentar (HABBOUT et al., 2013; PLAGEMANN et al., 1998; MCMILLEN; ADAM; MUHLHAUSLER, 2005).

Estudo de Rinaldi e colaboradores (2012) mostraram que ratos adultos oriundos de ninhada reduzida apresentaram aumento da ingestão alimentar, do peso corporal e do TAB, acompanhado de hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e redução do HDL- colesterol. Deste modo estes animais reproduzem eventos relacionados a SM e suas comorbidades, tal como DM2.

Além de modular redes neurais importantes no metabolismo energético, a hipernutrição no período lactacional promove também redução de volume de células β -pancreáticas, e distúrbios hepáticos na vida adulta (GAROFANO; CZERNICHOW; BREANT, 1998; GUILLOTEAU et al., 2009). Adicionalmente este modelo de programação lactacional induz ao longo da vida do animal, aumento na expressão e liberação de TNF- α e IL-6 pelo TAB, altera a responsividade ao estresse, elevando os níveis basais de corticosterona (BOULLU-CIOCCA et al., 2008). Contribuindo para a resistência à insulina e a falha da célula β -pancreática, processos que caracterizam o DM2.

2.6 FÍGADO

Nas situações em que há um excesso energético os lipídeos são armazenados no TAB na forma de triglicerídeos e a glicose na forma de glicogênio no músculo esquelético e no fígado (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006). A captação de glicose no tecido hepático é independente do hormônio insulina, todavia neste tecido a insulina reduz a degradação de glicogênio ou glicogenólise; diminui a gliconeogênese, um processo de síntese de glicose; além de promover o aumento da síntese e diminuição da degradação de proteínas no fígado (NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011; SALTIEL; KAHN, 2001; CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

As alterações que ocorrem na lactação, levando a programação, podem modular a função hepática, assim a prole oriunda de ninhada reduzida sofre mudanças na sinalização da insulina no fígado, bem como, desenvolve resistência à insulina hepática, induzindo o aumento da gliconeogênese e glicogenólise, contribuindo para o aumento nas concentrações de glicose no sangue, eventos relacionados com (CONCEIÇÃO et al., 2013; CESARETTI; KOHLMANN JUNIOR, 2006; HUANG; CZECH, 2007; MUOIO; NEWGARD, 2008).

A programação metabólica pode também desencadear a redução na sensibilização a outros hormônios e diminuição de células hepáticas (BATESON et al., 2004). Por exemplo, a oxidação de ácidos graxos hepática é modulada pela ação da leptina. Roedores oriundos de programação metabólica frequentemente desenvolvem resistência a leptina hepática, acompanhado de mudanças nas concentrações plasmáticas de leptina (KERSHAW; FLIER, 2004).

Na SM, situação em que há disfunção adipocitária, podem ocorrer depósitos de gordura no fígado e em outros órgãos, em decorrência da deficiência do TAB em atuar na reserva de triglicerídeos da dieta (DESPRÉS et al., 2008). Como já citado anteriormente, alterações na interação do fígado com outros órgãos estão envolvidos na fisiopatologia da obesidade (FRÜHBECK, 2008).

A SM está associada a alterações hepáticas graves, juntamente com o aumento da incidência de doença cardiovascular em indivíduos com esteatose hepática. A doença hepática gordurosa não alcoólica caracteriza-se pelo acúmulo de lipídeos no fígado, excedendo 5 a 10% do seu peso, ocasionando alterações histopatológicas significativas, aumento das concentrações de enzimas e alteração

na função hepática, variando de esteatose a esteato-hepatite, fibrose e cirrose (FESTI et al., 2004; CLAIN; LEFKOWITCH, 1987; ADAMS et al., 2005; GUPTE et al., 2004). Estudos apontam que a redução de ninhada acarreta alterações no fígado, sendo observado a infiltração de células inflamatórias e um estado de esteatose hepática (CONCEIÇÃO et al., 2013).

2.7 PÂNCREAS

O pâncreas endócrino é representado pelas ilhotas pancreáticas, que são formadas por tipos celulares diferentes. A célula β é o principal subtipo celular encontrado nas ilhotas pancreáticas, desempenhando a função de síntese e secreção de insulina, um hormônio que estimula a captação de glicose nos tecidos denominados insulino-dependentes (músculo e TAB), por favorecer a translocação e a inserção dos transportadores de glicose (GLUT-4) na membrana plasmática (LEIBIGER; LEIBIGER; BERGGREN, 2008; STEINER et al., 2010).

O pâncreas é um órgão com desenvolvimento embrionário complexo, com início da formação durante a gastrulação a partir de células endodérmicas. O crescimento e diferenciação destas células são dependentes das condições do meio em que se encontra durante a formação do órgão (OLIVER-KRASINSKI; STOFFERS, 2008). As células β possuem plasticidade celular, ou seja, o tecido pancreático pode sofrer hipoplasia ou hiperplasia de células β de acordo com a necessidade do organismo, e com isso determinar a regulação da produção de insulina (KARGAR; KTORZA, 2008). Adicionalmente a programação metabólica pode ocasionar no pâncreas a diminuição na sensibilidade de alguns hormônios, como a própria insulina (BATESON et al., 2004).

O pâncreas de roedores sofre remodelação durante os primeiros vinte dias pós-natal, compreendendo o período lactacional, uma fase crítica do desenvolvimento pancreático e do controle metabólico, sendo que eventos antes e após esse período podem ocasionar alterações neuronais, comprometendo a homeostase energética de forma que aumenta o risco a desordens metabólicas (BERLEZE, 2005; DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2002; PLAGEMANN et al., 1999). Estudos com roedores mostram que a hipernutrição durante a lactação promove hipertrofia em ilhotas pancreáticas, desde a instalação da obesidade até a vida

adulta (THOLE et al., 2012). As alterações ocasionadas no pâncreas tendem a se manter durante toda a vida (GITTES; PRASADAN; TULACHAN, 2010).

No estado de resistência à insulina, que pode estar presente em animais que sofreram programação metabólica, inclusive por redução de ninhada, a concentração de insulina basal não é eficiente para promover o influxo celular de glicose, assim, as células β em hiperplasia tendem a sintetizar e secretar ainda mais insulina, de modo que ocasiona a hiperinsulinemia associada à hiperglicemia crônica (GUILHERME et al., 2008).

Como já citado anteriormente, em roedores lactentes ocorre o desenvolvimento das ilhotas pancreáticas e do sistema neuronal hipotalâmico durante este período pós-natal precoce (PATEL; SRINIVASAN, 2011). E em humanos, estudos consideram o pâncreas sensível à programação devido as modificações que ocorrem nas ilhotas, do nascimento ao início da infância (REMACLE et al., 2007).

Já o pâncreas materno diminui de tamanho e densidade durante a lactação, devido à redução da atividade secretória das células β -pancreáticas. Estudos em roedores mostram que as menores concentrações circulantes de insulina estão associados à lactação quando comparados os períodos não gestacionais e gestacionais (BURNOL et al., 1986).

Conforme descrito anteriormente, a condição metabólica e morfológica materna tem efeitos diretos sobre o estado de saúde de seus descendentes, particularmente em momentos críticos do desenvolvimento como na lactação. Todavia, embora os efeitos a longo prazo da programação metabólica gerada no período lactacional sejam bem conhecidos, existem questões importantes que ainda não foram exploradas:

- i) Qual o impacto da redução de ninhada sobre o perfil metabólico e histomorfológico materno em diferentes fases lactacionais?
- ii) Que ajustes metabólicos e morfológicos são observados na prole de ninhada normal e reduzida durante as diferentes fases da lactação?
- iii) Há relação entre a condição materna e o estado da prole na lactação?

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar o efeito da manipulação do número de filhotes da ninhada sobre os parâmetros biométricos, metabólicos e histológicos maternos e sua repercussão sobre a prole em diferentes fases da lactação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir programação metabólica por redução de ninhada;
- Avaliar o efeito da redução de ninhada sobre o consumo alimentar das mães e os parâmetros biométricos maternos e da prole;
- Identificar modificações na composição do leite das ratas lactantes submetidas à redução de ninhada comparando com a composição do leite em mães com ninhada normal;
- Demonstrar o impacto da redução do número de filhotes da ninhada sobre a morfologia da glândula mamária em fases distintas da lactação;
- Analisar o perfil metabólico sérico das mães e da prole de ninhada normal e reduzida em diferentes etapas lactacionais;
- Avaliar o efeito da redução de ninhada sobre a histomorfologia hepática, pancreática e do tecido adiposo marrom em ratas lactantes em diferentes fases da lactação;
- Caracterizar a histologia pancreática e do tecido adiposo marrom em filhotes de ninhada normal e reduzida em diferentes etapas da lactação;
- Verificar o peso corporal, bem como, o peso de diferentes órgãos em diferentes etapas lactacionais dos animais oriundos de ninhada reduzida e ninhada normal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, cedidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) mediante aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da instituição, com o número do processo 033/2014 e protocolo 9895/2014 (Anexo A).

4.2 AMBIENTE

Os animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em caixas para roedores, com cama de maravalha, em condições de temperatura controlada de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com luminosidade em ciclo claro-escuro de 12 horas, alimentados com ração comercial balanceada e água potável *ad libitum*.

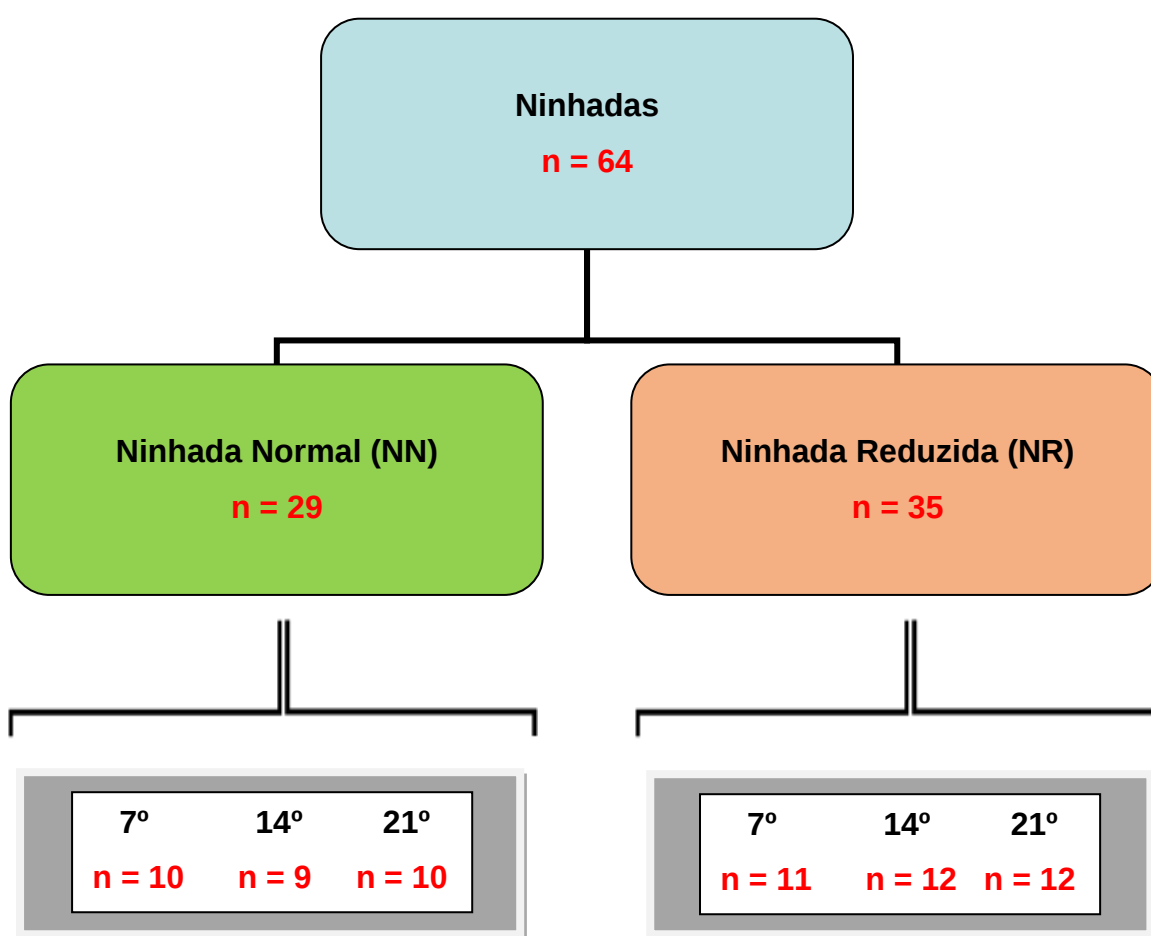
4.3 MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados 112 animais adultos, de 70 a 90 dias de vida, sendo 84 fêmeas nulíparas e 28 machos reprodutores. As fêmeas foram acasaladas no sistema de harém (3 fêmeas para cada macho), de forma que não houve cruzamento de parentesco entre os animais. Constatada a prenhes, as ratas foram separadas em caixas individuais e monitoradas diariamente para o registro do dia exato do nascimento dos filhotes.

Dos acasalamentos resultaram 64 ninhadas distribuídas em 2 grupos experimentais: Ninhada Normal (NN), com 9 filhotes e Ninhada Reduzida (NR), com 3 filhotes, conforme modelo estabelecido por Kennedy (1957). O número de filhotes da ninhada foi ajustado no 3º dia de lactação². Os grupos NN e NR foram subdivididos de acordo com a etapa de lactação, em 7º, 14º e 21º dias, conforme demonstra o fluxograma 1. A separação dos grupos foi realizada de forma que não

¹ Conforme Plagemann e colaboradores (1999c) a produção de leite pode ser ajustada de acordo com o número de filhotes da prole até o 3º dia de lactação. Desta forma, reduzindo a ninhada ao 3º dia garante maior aporte de leite à ninhada reduzida.

houvesse o encontro de duas ninhadas descendentes do mesmo macho reprodutor em cada grupo. Foi preconizado manter apenas filhotes machos nas ninhadas, quando não possível foram mantidas as fêmeas para completar a ninhada normal, já para as análises bioquímicas e histológicas foram selecionados apenas filhotes machos, 3 filhotes de cada ninhada, tanto de grupo NR quanto de grupo NN. Dessa forma, foi obtido um n de 27 a 30 filhotes para os grupos NN e de 33 a 36 filhotes para os grupos NR.



Fluxograma 1: Divisão das ninhadas em grupos experimentais.

4.4 MONITORAMENTO DO PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR

A partir do nascimento dos filhotes (dia 0 da lactação) até o dia de sacrifício de cada grupo correspondente, 7º, 14º e 21º dia, as mães e os filhotes foram pesados em dias alternados, no período da tarde, considerando que a lactação em

roedores ocorre até o 21º dia pós-natal (desmame). Simultaneamente, foi registrado o consumo alimentar de ração das mães³ em dias alternados, no período da tarde. Os dados de consumo alimentar materno foram expressos em g/100g de peso corporal. As pesagens foram realizadas em balança de precisão semi-analítica.

4.5 COLETA DE LEITE

No dia do experimento as mães foram submetidas à jejum alimentar de 8 horas antes da ordenha, sem jejum hídrico. Após 4 horas do jejum das mães os filhotes foram separados, completando 4 horas antes da ordenha para que ocorresse acúmulo de leite nas glândulas mamárias. Posteriormente, as mães foram anestesiadas por via intraperitoneal (IP) com uma mistura (v/v) cetamina 100mg/Kg e xilazina 2mg/Kg. Imediatamente após a indução anestésica as ratas receberam uma dose de ocitocina 20UI/Kg via IP, para estimular a ejeção do leite. Cinco minutos após a administração de ocitocina foi iniciada a ordenha manual das mamas da rata para coleta do leite que foi acondicionado em microtubos estéreis e imediatamente congelado a - 20° C.

4.6 EUTANÁSIA

O método de indução de eutanásia dos animais, mães e filhotes, foi a decapitação por guilhotina, seguindo o Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia de Animais (GBBPEA), devido ao método não comprometer tecidos ou órgãos dos animais, e por estes se tratarem de pequenos roedores. Adicionalmente, este método permite a coleta de sangue total, sem interferência de fármacos analgésicos e/ou anestésicos nos parâmetros plasmáticos que foram avaliados. O descarte das carcaças foi em sacos plásticos para material biológico infectante, posteriormente encaminhado ao Biotério Central, conforme normas internas.

² Ração disponível (200g) – ração restante (g) = ração consumida (g)

4.7 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS E DADOS BIOMÉTRICOS

Imediatamente após a decapitação dos animais foram realizadas a coleta de sangue total em tubo sem anticoagulante, o qual foi centrifugado a 3.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. O soro foi então coletado, armazenado em tubo sem aditivo e estéril e mantido congelado (-20°C) até o momento das dosagens bioquímicas. Adicionalmente foi realizado a mensuração do comprimento naso-anal (CNA), por régua métrica. Em seguida a cavidade abdominal foi laparotomizada para a retirada de cérebro, estômago, pâncreas, glândula adrenal e gordura interescapular dos filhotes; e das mães o fígado, pâncreas, glândula adrenal, glândula mamária e gordura ovariana, mesentérica, retroperitoneal e interescapular. Os tecidos e órgãos retirados foram imediatamente pesados em balança de precisão analítica, exceto a glândula mamária, sendo que os destinados à análises histológicas foram posteriormente transferidos para solução de formol 10% por 24 horas e depois para álcool etílico 70% até a realização da técnica histológica.

4.8 DOSAGENS SÉRICAS

As dosagens bioquímicas de glicose, triglicerídeos e proteínas totais nas amostras de soro sanguíneo das ratas lactantes e dos filhotes foram realizadas por espectrofotometria em analisador automatizado da marca Mindray® modelo BS-120. Foram empregados o método enzimático colorimétrico com leitura em comprimento de onda de 505nm à 37°C para as dosagens de glicose e triglicerídeos, método no qual a glicose sofre oxidação até a formação de um composto violáceo e o triglicerídeo é hidrolisado até formação de um composto de coloração cereja, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração dos mesmos. Para a dosagem de proteínas totais foi utilizado o método colorimétrico de Biureto com leitura em 545nm à 37°C, cujo método se baseia na reação das ligações peptídicas das proteínas com os íons cúpricos do reagente formando um complexo de cor violeta que é proporcional à concentração de proteínas no soro. Foram utilizados reagentes para determinação quantitativa da marca Analisa® (Gold Analisa Diagnóstica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Os valores foram expressos em mg/dL para glicose e triglicerídeos, e g/dL para proteínas totais.

4.9 ANÁLISE DO LEITE

4.9.1 Dosagens Bioquímicas

As dosagens bioquímicas de glicose, triglicerídeos e proteínas totais nas amostras de leite foram realizadas com os mesmos reagentes, equipamentos e métodos descritos anteriormente para as dosagens séricas. Os valores foram expressos em mg/dL para glicose e triglicerídeos, e g/dL para proteínas totais.

4.9.2 Crematócrito

Foi realizado o crematócrito⁴, no qual uma amostragem de 70µL de leite integral foi colocado por capilaridade em tubo capilar e centrifugado à 3.500rpm por 15 minutos, procedimento realizado em duplicata para cada amostra. A porção sobrenadante resultante após a centrifugação constitui o soro do leite, enquanto a porção sedimentada representa o creme, que contém a grande parte dos lipídeos, carboidratos e proteínas do leite.

As colunas de creme e soro obtidas foram medidas com régua métrica e expressas em milímetros (mm). Foram realizados os cálculos a partir dos valores medidos das colunas obtidas para estimar o valor calórico e porcentagem de gordura do leite, usando fatores de conversão de kcal/g de lipídeos, carboidratos e proteínas.

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:

$$\text{coluna de creme (mm)} \times 100 / \text{coluna total (mm)} = \% \text{ de creme}$$

Avaliação do teor de gordura:

$$(\% \text{ de creme} - 0,59) / 1,46 = \% \text{ de gordura}$$

³ Técnica analítica de estimativa do conteúdo energético do leite (LUCAS et al., 1978; COLLARES; GONÇALVES; FERREIRA, 1997).

Cálculo do conteúdo energético total:

$$(\% \text{ de creme} \times 66,8 + 290) = \text{kcal/L}$$

Sendo que:

Coluna total = coluna de soro + coluna de creme

Coluna de creme = componentes lipossolúveis + conteúdo proteico

4.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foi seguido o protocolo de técnica histológica do Laboratório de Histologia da UEPG. As amostras de pâncreas e gordura interescapular dos filhotes, assim como fígado, pâncreas, glândula mamária e gordura interescapular das mães foram fixados em formol 10% por 24 horas e posteriormente mantidos em álcool etílico 70% até a realização da desidratação. Em seguida os tecidos foram submetidos a desidratação em condições crescentes de álcool etílico (80%, 90% e absoluto 99,5%), passando posteriormente pelo processo de clarificação em xilol, impregnação com parafina líquida (60°C) e finalmente inclusão.

Os blocos foram então cortados em micrótomo rotativo manual da marca Leica® modelo RM2125, em secções com espessura de 5 µm. Para evitar análises dos mesmos segmentos cada peça de tecido foi submetida a 2 cortes semi-seriados com intervalos de 100 µm entre cada corte.

Os cortes foram fixados em lâmina de microscopia com solução de albumina; desparafinizados e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). As lâminas coradas foram focalizadas em aumento de 400x e fotografadas em microscópio óptico da marca Olympus modelo CX31 com câmera digital Olympus C-7070. Foi fotografado um campo aleatório de cada uma das lâminas e avaliado o dimensionamento das células e tecidos pelo programa de computador Image J. As especificações de análise de cada órgão foram: i) pâncreas, área das ilhotas; ii) fígado, número de núcleos de hepatócitos/ campo e análise qualitativa da presença de vesículas de gordura; iii) TAM, número de núcleos de adipócitos/ campo e análise qualitativa do tamanho das vesículas de gordura; iv) glândula mamária, contagem de adipócitos/ campo e análise qualitativa dos ácinos mamários.

4.11 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

Para mães e filhotes foram obtidos o cálculo do Índice de Lee (IL), um indicador de obesidade para roedores, segundo a fórmula: $\text{Peso Corporal (g)}^{1/3} / \text{CNA (cm)} \times 1000$, estabelecida por Bernardis e Patterson (1968).

Dos tecidos e órgãos retirados, como: cérebro, estômago, pâncreas, glândula adrenal e gordura interescapular dos filhotes; fígado, pâncreas, gordura interescapular, ovariana, mesentérica e retroperitoneal das mães foram expressos as proporções de peso relativo de cada tecido/órgão em relação ao peso corporal de cada animal, conforme a fórmula: $\text{Tecido/Órgão (g)} / \text{Peso Corporal (g)} \times 100$, para as mães; e $\text{Tecido/Órgão (g)} / \text{Peso Corporal (g)}$ para os filhotes. Assim, os dados foram expressos em g/100g de peso corporal para as mães e g/g de peso corporal para os filhotes.

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm) e avaliados com auxílio do programa GraphPad Prism® 5.01. Diferenças estatísticas entre os grupos NN e NR foram verificadas pelo teste t de Student's. Para a verificação de diferenças estatísticas entre as etapas da lactação (7º, 14º e 21º dia) dentro de cada grupo foi utilizada a Análise de Variância Simples (One Way ANOVA), com pós teste de Tukey. Em ambas as análises foi adotado como critério de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DAS MÃES

A redução do número de filhotes da ninhada não ocasionou alteração no Índice de Lee das mães em nenhuma etapa da lactação, como é demonstrado na figura 1A. O consumo alimentar materno foi afetado pelo número de filhotes da prole durante a lactação, conforme demonstram os dados da figura 1B. Mães-NR apresentaram redução no consumo alimentar de 25% no 7º dia; 24% no 14º dia e 30% ao 21º dia de lactação comparado as Mães-NN nos mesmos períodos lactacionais ($p<0,05$). Adicionalmente, em ambos os grupos o consumo alimentar materno foi progressivamente elevado durante as diferentes fases da lactação. No grupo de Mães-NN o consumo alimentar foi 40% e 93% maior no 14º e 21º dia, respectivamente, em relação ao 7º dia da lactação. Entre o 14º e 21º dia este aumento foi de 39% ($p<0,05$). Similarmente em Mães-NR no 14º e 21º dia de lactação o consumo alimentar foi 43% e 82% maior respectivamente em relação ao 7º dia. Neste grupo entre o 14º e 21º dia de lactação houve aumento de 27% no consumo alimentar ($p<0,05$).

A redução de ninhada não alterou os depósitos de TAB ovariana (figura 1C) e mesentérica (figura 1D). Todavia, o depósito retroperitoneal foi 95% e 90% maior ao 14º e 21º dia de lactação respectivamente em Mães-NR comparado as Mães-NN (figura 1E; $p<0,05$). Ao longo da lactação os estoques de gordura ovariana e retroperitoneal do grupo de Mães-NN foram reduzidos aproximadamente 42% e 54% respectivamente no 14º e 21º dia em relação ao 7º dia de lactação ($p<0,05$). Redução de 35% no conteúdo de gordura ovariana também foi observado no grupo de Mães-NR no 7º dia comparado ao 21º dia de lactação ($p<0,05$).

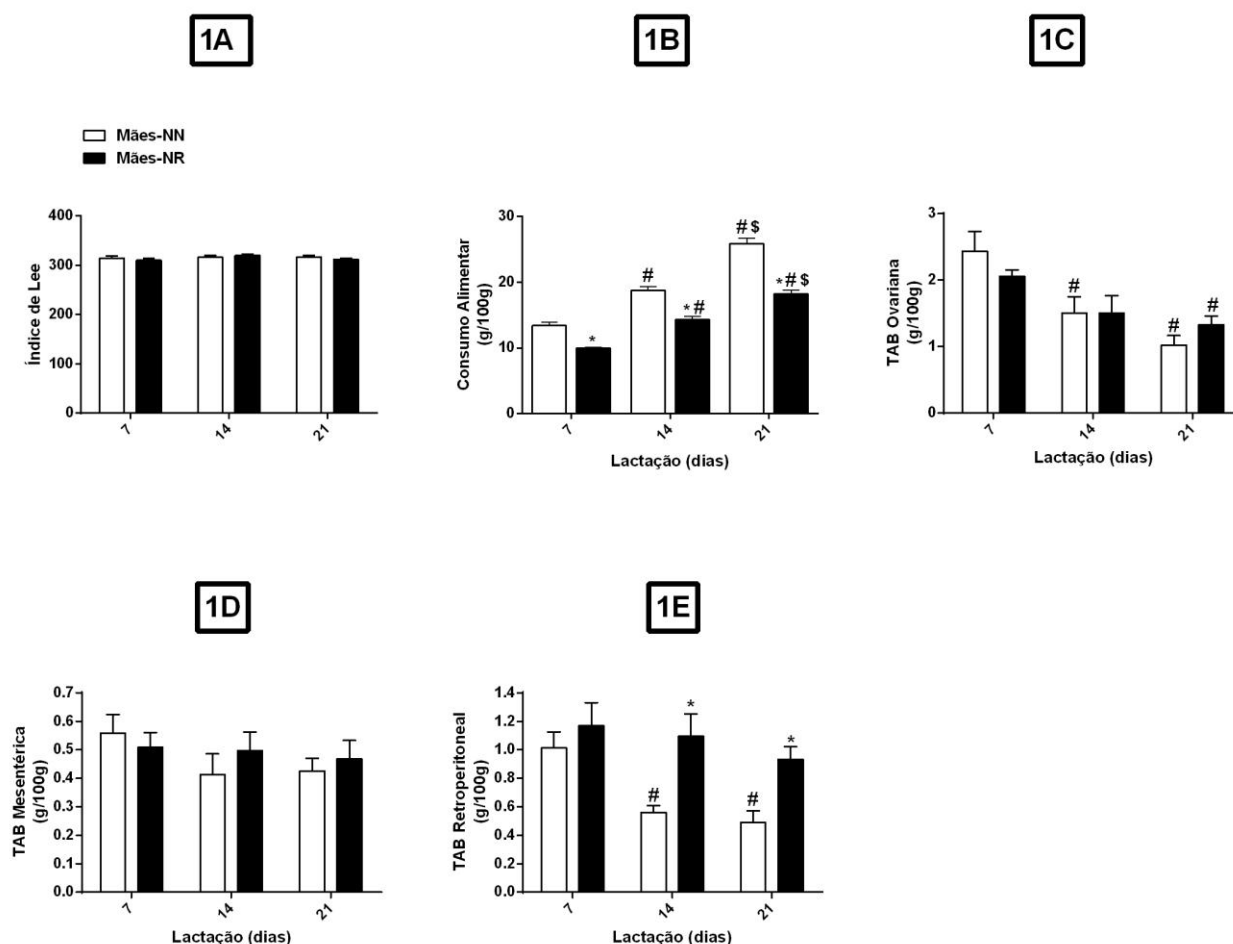


Figura 1: Efeito da redução do número de filhotes da prole sobre o Índice de Lee, consumo alimentar e estoques de Tecido Adiposo Branco (TAB) das mães em diferentes fases da lactação.

Os valores estão expressos em média $\pm$ epm; o símbolo (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de Student entre os grupos da mesma etapa de lactação (NN x NR); os símbolos (# e \$) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pela ANOVA com pós-teste de Tukey entre os mesmos grupos (NN x NN; NR x NR) em etapas diferentes da lactação (7° x 14° x 21° dias), sendo que # representa diferença com o 7° e \$ diferença com o 14° dia da lactação; as unidades de medida, exceto para o Índice de Lee, representam o valor em gramas (g)/ 100 g de peso corporal do animal; NN = Ninhada Normal, NR = Ninhada Reduzida; n = 9-12 animais/ grupo.

O depósito de gordura e o número de adipócitos do TAM interescapular (figuras 2A e 2B) de Mães-NR não foram alterados pela redução do número de filhotes da ninhada. Todavia, redução dos estoques de triglicerídeos foi histologicamente observada no TAM, visto que Mães-NR (figuras 2F, 2G, 2H) apresentaram gotículas de gordura intracelular em menor número em relação ao TAM de Mães-NN (figuras 2C, 2D, 2E). Mães-NR reduziram 40% no conteúdo de gordura interescapular ao 14° e 21° dia da lactação comparado ao 7° ($p < 0,05$).

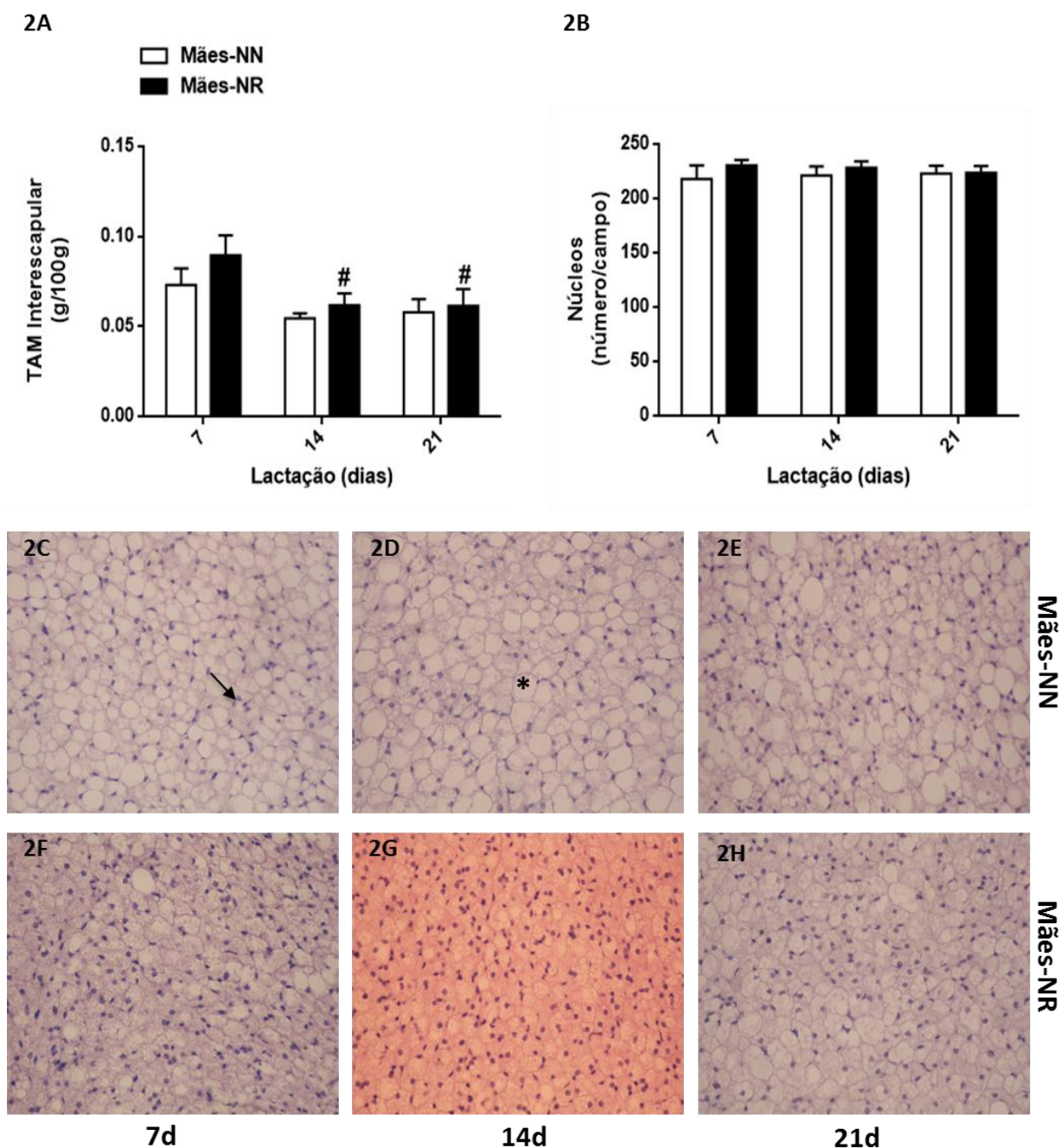


Figura 2: Efeito da redução do número de filhotes da prole sobre o estoque e número de adipócitos no Tecido Adiposo Marrom (TAM) das mães em diferentes fases da lactação.

Os valores estão expressos em média $\pm$ epm; o símbolo (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) pela ANOVA com pós-teste de Tukey, representando diferença com o 7º dia da lactação; a seta na imagem indica o núcleo do adipócito, o símbolo (*) na imagem indica a vesícula de gordura; a unidade de medida para o estoque de TAM é o valor em gramas (g)/ 100 g de peso corporal do animal, a unidade para o número de núcleos de adipócitos é o número/ campo; a espessura das secções foram de 5 μ m, em coloração de HE e aumento de 400x; NN = Ninhada Normal, NR = Ninhada Reduzida; n = 9-12 animais/ grupo para o estoque de TAM e n = 8-10 para a análise histológica.

Nas três etapas lactacionais avaliadas o peso do fígado (figura 3A) de Mães-NR foi cerca de 15% menor quando comparado ao grupo de Mães-NN ($p < 0,05$). Já o número de hepatócitos (figura 3B) em Mães-NR foi maior em 23% no 7º dia, 22% no 14º e 29% no 21º dia da lactação, foi observado também a diminuição significativa da contagem celular no decorrer da lactação, em comparação com o 7º ao 21º dia em Mães-NR e Mães-NN, em 11% e 15% respectivamente. Na análise qualitativa não foi visualizado depósito de gordura no fígado (3C-3H), sem indícios de esteatose hepática.

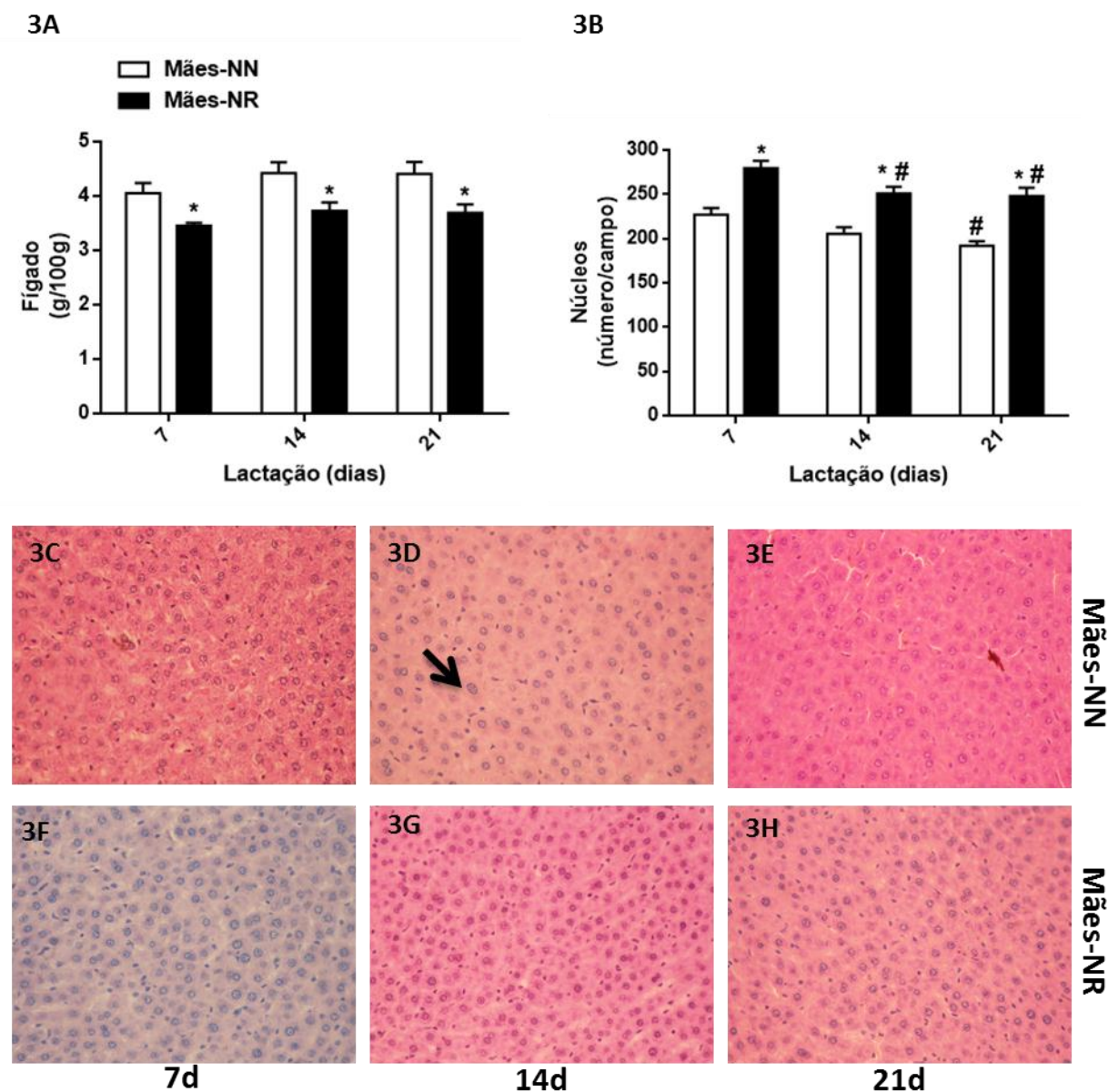
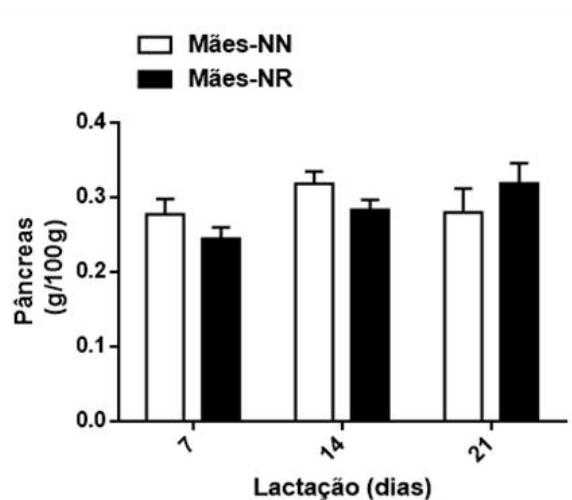


Figura 3: Efeito da redução do número de filhotes da prole sobre o peso do fígado e número de hepatócitos das mães em diferentes fases da lactação.

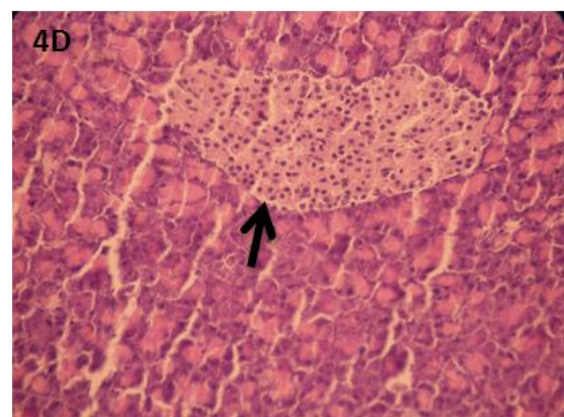
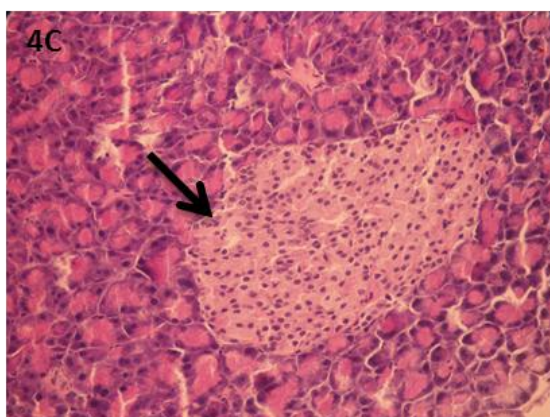
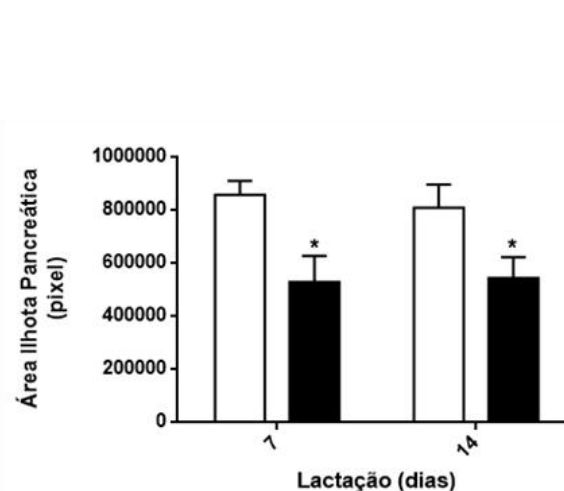
Os valores estão expressos em média $\pm$ epm; o símbolo (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de Student entre os grupos da mesma etapa de lactação (NN x NR); o símbolo (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) pela ANOVA com pós-teste de Tukey, representando diferença com o 7º dia da lactação; a seta na imagem indica o núcleo do hepatócito; a unidade de medida para o peso de fígado é o valor em gramas (g)/ 100 g de peso corporal do animal, a unidade para o número de núcleos de hepatócitos é o número/ campo; a espessura das secções foram de 5 μ m, em coloração de HE e aumento de 400x; NN = Ninhada Normal, NR = Ninhada Reduzida; n = 9-12 animais/ grupo para o peso do fígado e n = 9-11 para a análise histológica.

A redução no número de filhotes na ninhada não ocasionou mudança no peso do pâncreas em mães (figura 4A). Foi também verificado que não ocorreu alteração de peso de pâncreas materno durante o período da lactação. Todavia, nos períodos analisados do 7º e 14º dia da lactação, Mães-NR apresentaram redução de 38% e 33%, respectivamente, na área de ilhotas pancreáticas (figura 4B), podendo ser confirmado nas figuras 4C-4F.

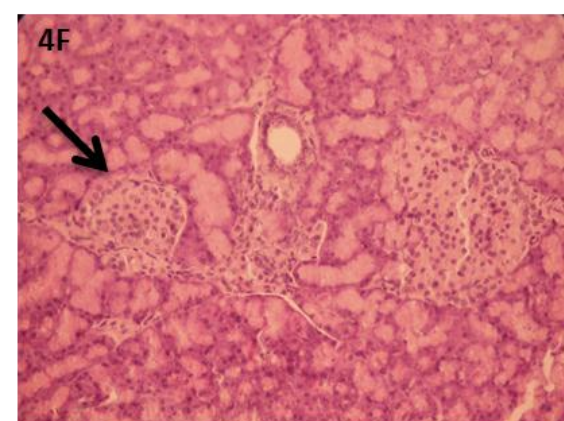
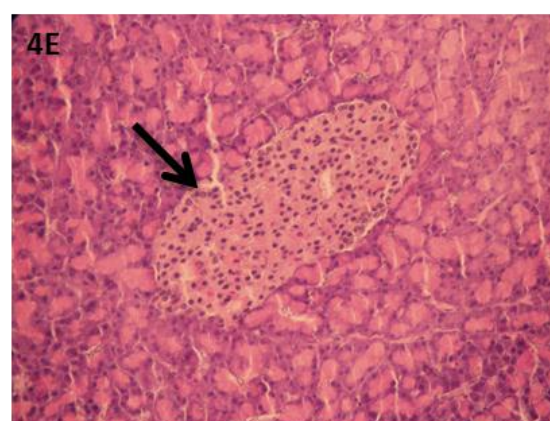
4A



4B



Mães-NN



Mães-NR

7d

14d

Figura 4: Efeito da redução do número de filhotes da prole sobre o peso do pâncreas e área das ilhotas pancreáticas das mães em diferentes fases da lactação.

Os valores estão expressos em média $\pm$ epm; o símbolo (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de Student entre os grupos da mesma etapa de lactação (NN x NR); a seta na imagem indica a ilhota pancreática; a unidade de medida para o peso de pâncreas é o valor em gramas (g)/ 100 g de peso corporal do animal, a unidade para a área das ilhotas é o pixel; a espessura das secções foram de 5 μ m, em coloração de HE e aumento de 400x; NN = Ninhada Normal, NR = Ninhada Reduzida; n = 9-12 animais/ grupo para o peso do pâncreas, n = 7-9 animais/grupo para a análise histológica.

Os parâmetros bioquímicos séricos das mães estão representados na figura 5. Mães-NR apresentaram aumento de 32% na glicemia no 14º e 21º dia de lactação em relação às Mães-NN ($p < 0,05$). Os triglicerídeos e as proteínas totais foram similares entre os grupos e etapas da lactação.

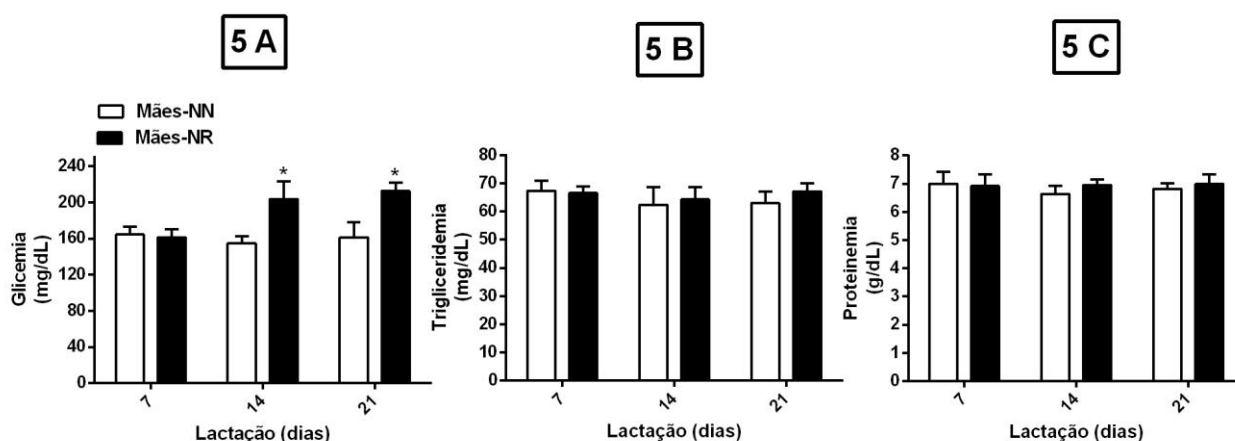


Figura 5: Efeito da redução do número de filhotes da prole sobre o perfil metabólico das mães em diferentes fases da lactação.

Os valores estão expressos em média $\pm$ epm; o símbolo (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de Student entre os grupos da mesma etapa de lactação (NN x NR); a unidade de medida para a glicose e o triglicerídeo sérico é mg/dL e para as proteínas totais é g/dL; NN = Ninhada Normal, NR = Ninhada Reduzida; n = 8-10 amostras/ grupo para a glicemia, n = 9-11 para a trigliceridemia e n = 6-9 para a proteinemia.

Conforme demonstram os dados da figura 6, o número de filhotes da prole alterou a composição do leite materno. O teor energético do leite (figura 6A) em Mães-NR foi em média 25% maior que o leite de Mães-NN nas 3 etapas da lactação avaliadas ($p<0,05$). O leite de Mães-NR também apresentou maior teor de gordura (figura 6B), aproximadamente 27% quando comparado ao leite de Mães-NN ($p<0,05$). A concentração de triglicerídeos (figura 6C) foi 25% maior no leite de Mães-NR ao 7º dia de lactação em relação ao leite de Mães-NN no mesmo período lactacional. Adicionalmente no 21º dia de lactação o leite de Mães-NR apresentou redução de 17% no conteúdo de proteínas (figura 6E) em relação ao leite de Mães-NN ($p<0,05$). A histomorfologia da GM foi alterada pela redução do número de filhotes da ninhada. A GM de Mães-NR apresentou menor desenvolvimento alveolar, acompanhado de maior acúmulo de adipócitos brancos ($p<0,05$), nas 3 etapas da lactação analisadas, como demonstra a figura 6F.

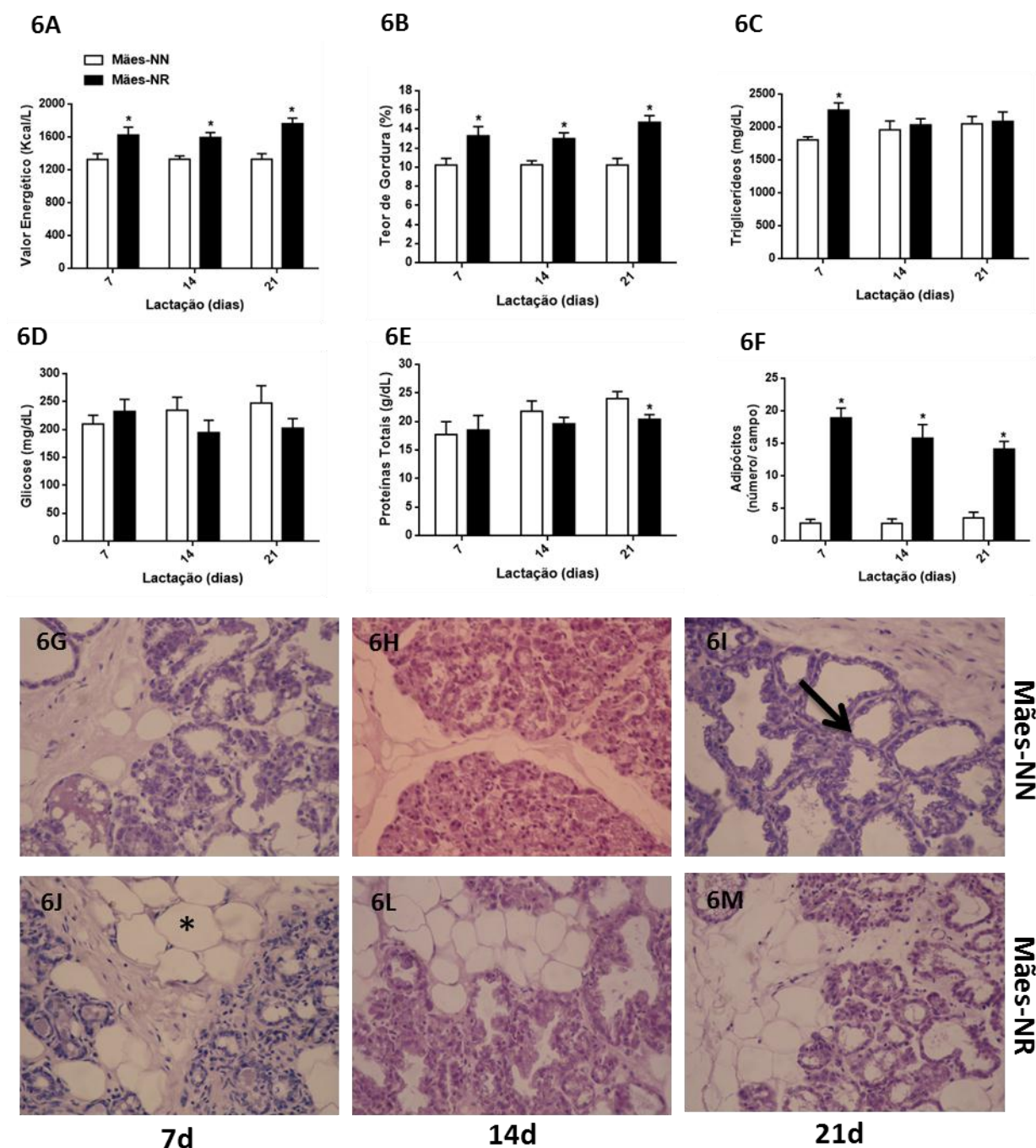


Figura 6: Efeito da redução do número de filhotes da prole sobre a composição do leite materno e sobre a histomorfologia da glândula mamária em diferentes fases da lactação.

Os valores estão expressos em média $\pm$ epm; o símbolo (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de Student entre os grupos da mesma etapa de lactação (NN x NR); a seta na imagem indica o alvéolo mamário e o símbolo (*) indica os adipócitos brancos; a espessura das secções foram de 5 μ m, em coloração de HE e aumento de 400x; NN = Ninhada Normal, NR = Ninhada Reduzida; n = 6-12 amostras/ grupo para as análises de composição do leite e n = 9-11 para a análise histológica.

5.2 DADOS DA PROLE

O peso corporal dos filhotes durante a lactação está representado na figura 7A. Em ambos os grupos os filhotes apresentaram significativo ganho de peso nas etapas de 7º e 14º dia lactacional. No grupo de Filhotes-NN houve aumento de aproximadamente 20g do 7º ao 21º dia de lactação. No mesmo período Filhotes-NR ganharam quase 30g. Deste modo, o peso corporal dos Filhotes-NR no 14º e 21º dia de lactação foi 22% e 25% respectivamente maior em relação aos Filhotes-NN ($p<0,05$). Os Filhotes-NR tiveram maior CNA (figura 7B) nas 3 etapas da lactação comparados aos Filhotes-NN, respectivamente observado o aumento de 2,4%, 5,4% e 4,4% no decorrer da lactação. A prole de ninhada reduzida apresentou aumento no Índice de Lee em 2,4% ao 14º dia e 5,7% ao 21º dia da lactação, como é demonstrado na figura 7C.

Em relação ao peso de órgãos da prole, observamos que em ambos os grupos experimentais ocorreu uma redução do tamanho do cérebro dos filhotes ao longo das diferentes fases lactacionais avaliadas (figura 7D). O peso do cérebro dos Filhotes-NN no 7º e 14º dia de lactação foi respectivamente 37% e 30% maior que ao 21º dia de lactação ($p<0,05$). Neste grupo, houve uma redução de 23% no peso do cérebro do 14º ao 21º dia de lactação ($p<0,05$). Adicionalmente, o peso do cérebro dos Filhotes-NR foi 13%, 21% e 19% menor respectivamente no 7º, 14º e 21º dia de lactação quando comparado ao peso do cérebro dos Filhotes-NN ($p<0,05$).

Em Filhotes-NN o peso do estômago (figura 7E) foi 39% e 58% maior no 21º dia de lactação em relação ao 7º e 14º dia, respectivamente ($p<0,05$). Apenas no 14º dia de lactação o peso do estômago foi 30% maior em Filhotes-NR comparado aos Filhotes-NN ($p<0,05$). O peso da glândula adrenal aumentou em ambos os grupos ao longo da lactação (figura 7F). Nos Filhotes-NN o peso da glândula adrenal no 21º dia foi 40% e 70% maior em relação ao 14º e 7º dia de lactação, respectivamente. Similarmente o peso da adrenal aos 21 dias de lactação foi 25% e 80% maior respectivamente em relação ao 14º e 7º dia de lactação no grupo de Filhotes-NR ($p<0,05$). Adicionalmente, no 7º e 21º de lactação o peso da glândula adrenal foi aproximadamente 20% menor nos Filhotes-NR em relação aos Filhotes-NN ($p<0,05$).

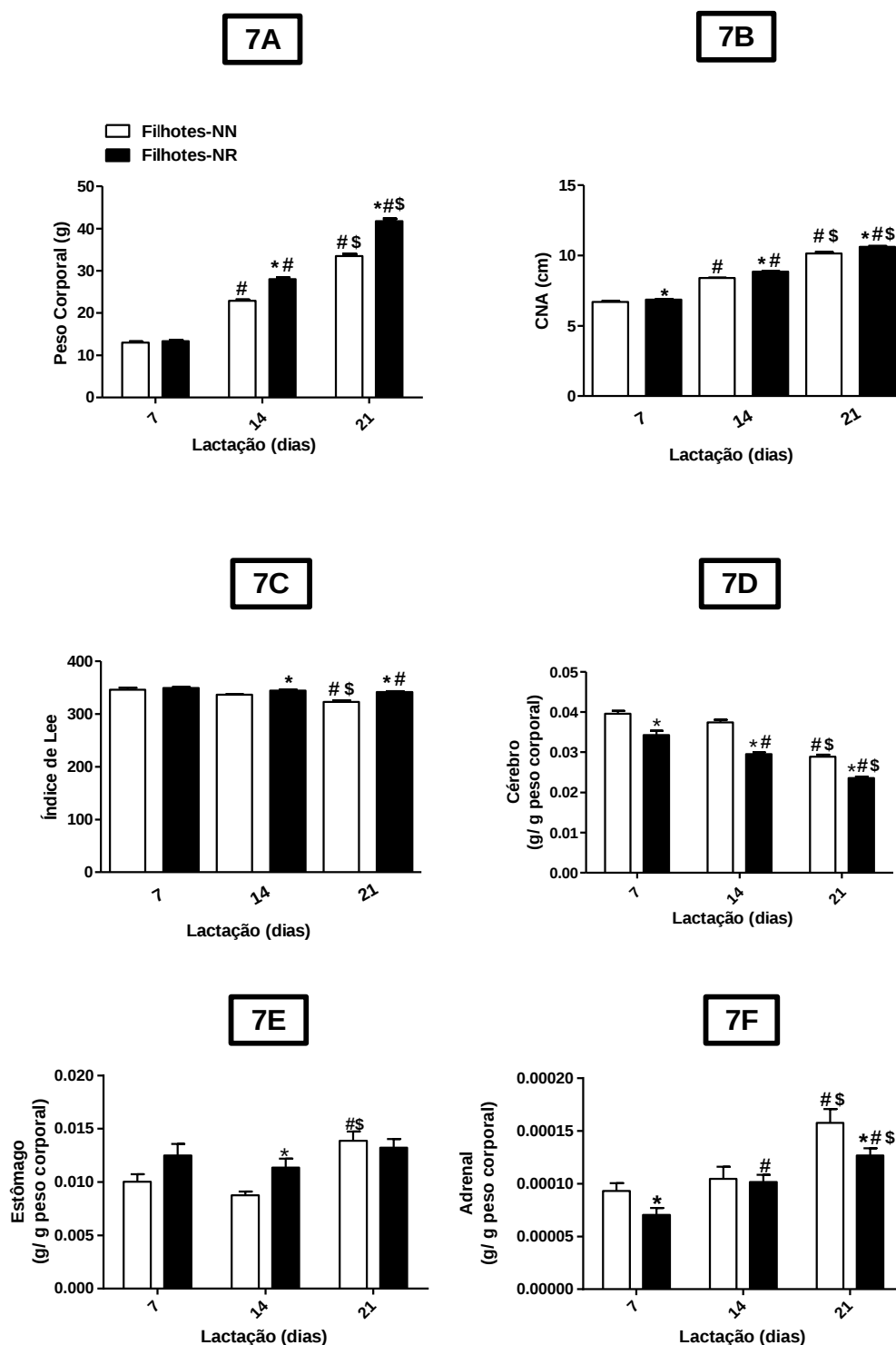


Figura 7: Efeito da redução de ninhada sobre os parâmetros biométricos e o peso de órgãos dos filhotes em diferentes fases da lactação.

Os valores estão expressos em média $\pm$ epm; o símbolo (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de Student entre os grupos da mesma etapa de lactação (NN x NR); os símbolos (# e \$) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pela ANOVA com pós-teste de Tukey entre os mesmos grupos (NN x NN; NR x NR) em etapas diferentes da lactação (7º x 14º x 21º dias), sendo que # representa diferença com o 7º e \$ diferença com o 14º dia da lactação; CNA = comprimento naso-anal, IL = Índice de Lee, NN = Ninhada Normal, NR = Ninhada Reduzida; n = 27-36 animais/ grupo.

A figura 8 representa o perfil bioquímico sérico dos filhotes. Em ambos os grupos a glicemia foi progressivamente elevada ao longo da lactação (figura 8A). Aos 21 dias de lactação, a glicemia foi 50% e 28% maior respectivamente ao 7º e 14º dia no grupo de Filhotes-NN. Similarmente aos 21 dias de lactação a glicemia foi 14% maior em relação ao 7º dia no grupo de Filhotes-NR ($p<0,05$). A glicemia foi 30% e 18% maior nos Filhotes-NR, respectivamente ao 7º e 14º dia em relação as mesmas etapas nos Filhotes-NN ($p<0,05$). Contrariamente, a concentração de triglicerídeos foi reduzida ao longo da lactação em ambos os grupos (figura 8B). No 14º dia de lactação a trigliceridemia foi 41% e 36% menor respectivamente nos Filhotes-NN e Filhotes-NR em relação ao 7º dia de lactação. Similarmente no 21º dia de lactação a trigliceridemia foi 55% e 53% menor respectivamente nos Filhotes-NN e Filhotes-NR em relação ao 7º dia de lactação ($p<0,05$). A concentração de proteínas totais (figura 8C) foi em média 14% maior nos Filhotes-NR ao 14º e 21º dias de lactação em relação aos Filhotes-NN nas mesmas etapas lactacionais ($p<0,05$). No grupo de Filhotes-NN a concentração de proteínas no plasma foi 20% menor no 14º dia em relação ao 7º dia de lactação ($p<0,05$).

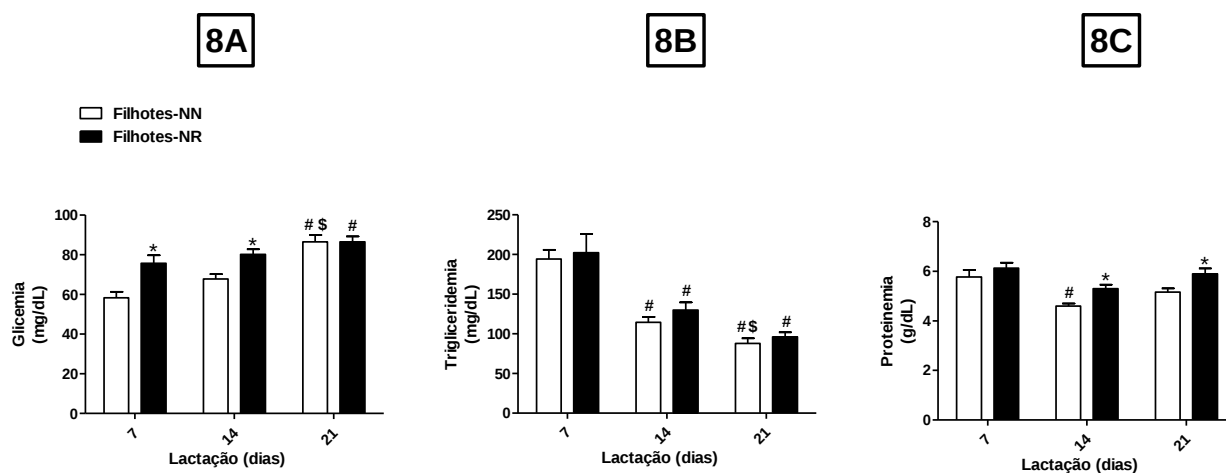


Figura 8: Efeito da redução de ninhada sobre o perfil metabólico dos filhotes em diferentes fases da lactação.

Os valores estão expressos em média $\pm$ epm; o símbolo (*) indica diferença significativa ($p<0,05$) pelo teste t de Student entre os grupos da mesma etapa de lactação (NN x NR); os símbolos (# e \$) indicam diferença significativa ($p<0,05$) pela ANOVA com pós-teste de Tukey entre os mesmos grupos (NN x NN; NR x NR) em etapas diferentes da lactação (7º x 14º x 21º dias), sendo que # representa diferença com o 7º e \$ diferença com o 14º dia da lactação; NN = Ninhada Normal, NR = Ninhada Reduzida; n = 14-28 amostras/ grupo para a glicemia, n = 14-25 para a trigliceridemia e n = 11-31 para a proteinemia.

As fases da lactação não afetaram o peso do TAM interescapular em ambos os grupos de filhotes (figura 9A). Todavia, o peso deste tecido foi 33% e 30% respectivamente maior nos Filhotes-NR no 7º e 14º dia de lactação em relação ao grupo de Filhotes-NN na mesma etapa lactacional ($p<0,05$). Filhotes-NR ao 21º dia da lactação apresentaram redução de 18% na contagem de núcleos de adipócitos por campo, como é demonstrado na figura 9B. Adicionalmente, Filhotes-NR apresentaram diminuição na contagem de núcleos no 21º dia da lactação comparados ao 7º e 14º dias, de 30% e 25%, respectivamente ($p<0,05$). Na análise histológica qualitativa foi verificado que Filhotes-NR apresentaram maior quantidade de vesículas grandes de gordura no tecido nas 3 etapas da lactação, como pode ser evidenciado comparando as figuras 9C, 9D e 9E (Filhotes-NN) às figuras 9F, 9G e 9H (Filhotes-NR).

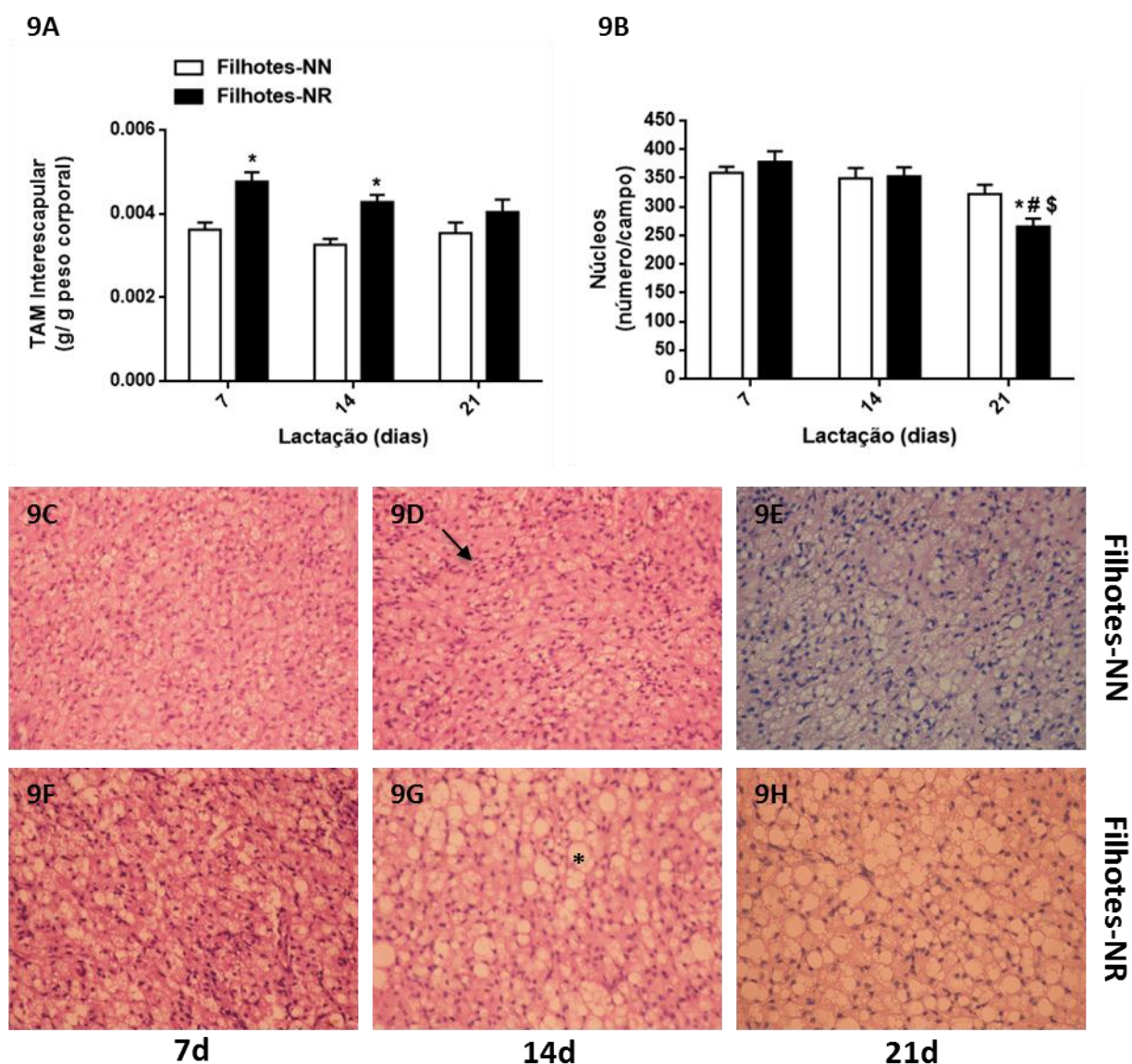


Figura 9: Efeito da redução de ninhada sobre o estoque e número de adipócitos no Tecido Adiposo Marrom (TAM) dos filhotes em diferentes fases da lactação.

Os valores estão expressos em média $\pm$ epm; o símbolo (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de Student entre os grupos da mesma etapa de lactação (NN x NR); os símbolos (# e \$) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pela ANOVA com pós-teste de Tukey entre os mesmos grupos (NN x NN; NR x NR) em etapas diferentes da lactação (7º x 14º x 21º dias), sendo que # representa diferença com o 7º e \$ diferença com o 14º dia da lactação; a seta na imagem indica o núcleo do adipócito e o símbolo (*) indica a vesícula de gordura; a unidade de medida para o estoque de TAM é o valor em gramas (g)/ 100 g de peso corporal do animal, a unidade para o número de núcleos de adipócitos é o número/ campo; a espessura das secções foram de 5µm, em coloração de HE e aumento de 400x; NN = Ninhada Normal, NR = Ninhada Reduzida; n = 27-36 animais/ grupo para o estoque de TAM e n = 9-11 para a análise histológica.

Interessantemente, o peso do pâncreas dos filhotes foi elevado durante a progressão da lactação em ambos os grupos (Figura 10A). O peso do pâncreas nos Filhotes-NN aumentou 45% e 102%, respectivamente, no 14º e 21º dia de lactação em relação ao 7º dia lactacional. Neste grupo houve aumento de 38% no peso do pâncreas do 14º ao 21º dia lactacional. Similarmente, no 21º dia o peso do pâncreas no grupo de Filhotes-NR foi 70% e 49% maior em relação ao 7º e 14º dia, respectivamente ($p < 0,05$). O peso do pâncreas de Filhotes-NR foi 36% maior no 7º dia e 18% no 21º dia da lactação em relação ao grupo de Filhotes-NN ($p < 0,05$). Na análise histológica não foi observado nenhuma diferença significativa na área das ilhotas pancreáticas da prole entre os grupos e entre as etapas da lactação.

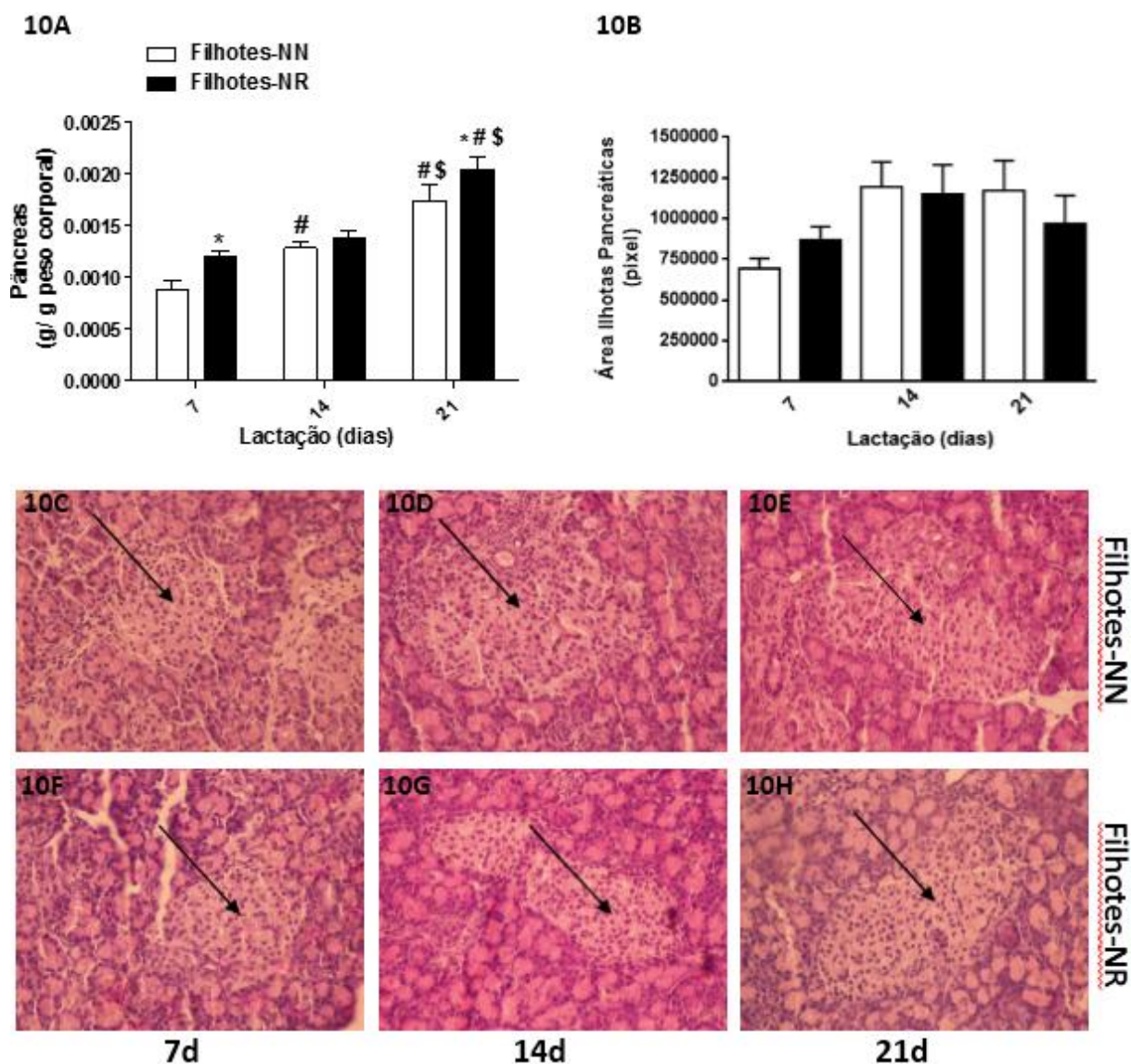


Figura 10: Efeito da redução de ninhada sobre o peso do pâncreas e área das ilhotas pancreáticas dos filhotes em diferentes fases da lactação.

Os valores estão expressos em média $\pm$ epm; o símbolo (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de Student entre os grupos da mesma etapa de lactação (NN x NR); os símbolos (# e \\$) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pela ANOVA com pós-teste de Tukey entre os mesmos grupos (NN x NN; NR x NR) em etapas diferentes da lactação (7º x 14º x 21º dias), sendo que # representa diferença com o 7º e \\$ diferença com o 14º dia da lactação; a seta na imagem indica a ilhota pancreática; a unidade de medida para o peso de pâncreas é o valor em gramas (g)/ 100 g de peso corporal do animal, a unidade para a área das ilhotas é o pixel; a espessura das secções foram de 5µm, em coloração de HE e aumento de 400x; NN = Ninhada Normal, NR = Ninhada Reduzida; n = 27-36 animais/ grupo para o peso do pâncreas e n = 6-8 para a análise histológica.

6 DISCUSSÃO

O equilíbrio energético materno é modificado no período lactacional pela demanda aumentada de energia necessária para a produção de leite, sendo considerado o período de maior exigência energética na vida de uma fêmea (NOGUEIRA NETO, 2008; PRIEGO et al., 2013). Deste modo o número de filhotes durante a lactação pode ser um fator determinante no gasto energético. O menor consumo alimentar observado em Mães-NR pode estar relacionado à menor demanda energética lactacional, como demonstram por Król e colaboradores (2011) e Cancian (2014).

Adicionalmente estudos em diferentes espécies de mamíferos tem demonstrado que o número de mamilos sugados é o principal estímulo à lactação, uma vez que é o principal estímulo para a liberação de prolactina. A prolactina é o principal hormônio da lactogênese, tendo evidentes efeitos estimuladores da ingestão alimentar via ações hipotalâmicas (WOODSIDE; POPESKI, 1998). Como explica Woodside e Popeski (1998), com a redução do número de filhotes da ninhada há menor estímulo de mamilos, com isso menor secreção de prolactina e consequentemente diminuição da hiperfagia de lactação mediado por este hormônio. Segundo Woodside, Abizaid e Walker (2000), outro hormônio importante durante a lactação é a leptina, a qual frequentemente encontra-se em níveis baixos nesta fase, contribuindo para hiperfagia. Deste modo, aumento nas concentrações de leptina poderiam resultar em redução no consumo alimentar, como observado nas Mães-NR. A leptina é primariamente produzida pelos adipócitos (SAGAWA et al., 2002), conforme descrito a seguir o teor adiposo muda em Mães-NR reforçando a ideia de que neste caso há aumento dos níveis circulantes de leptina.

O TAB regula o equilíbrio energético pelos processos de estoque e gasto de gordura, sendo a lactação um período de mudança no TAB com acentuada lipólise em seus depósitos (FRÜHBECK, 2008; VERNON, 2005). O TAB tem uma atuação fundamental no suporte de energia durante a lactação, sendo que em ratos e camundongos é evidenciado a utilização de 60 à 70% dos estoques de lipídeos durante a lactação (FLINT et al., 2003; VERNON; POND, 1997). Dos diferentes estoques de TAB avaliados o depósito ovariano e retroperitoneal apresentaram queda ao longo da lactação em Mães-NN, sugerindo que estas gorduras sejam

preferencialmente mobilizadas durante a lactogênese, diferentemente ao depósito de gordura mesentérica que se manteve ao longo deste período. A redução do número de filhotes promoveu maior acúmulo do depósito retroperitoneal em Mães-NR, evidenciando que este depósito está sofrendo menos lipólise, provavelmente pela menor demanda energética da mãe amamentando menor número de filhotes. Com isso, é sugerido que a gordura ovariana é a mais sensível à lipólise durante o período lactacional. Entretanto, Saremi e colaboradores (2014), em estudo semelhante, demonstraram que o TAB retroperitoneal é mais sensível à alteração durante a lactação.

Nosso estudo também acompanhou o peso e aspectos morfológicos do TAM em mães em diferentes etapas da lactação. Estudos demonstram que durante a síntese do leite a elevação da produção de calor exige mecanismo de dissipação deste. Neste sentido é observado redução da termogênese no TAM durante a lactação, favorecendo a dissipação do calor e reduzindo o gasto energético a fim de poupar para a produção de leite (KRÓL et al., 2011; PEDRAZA et al., 2000). Segundo outro estudo o calor gerado na síntese de leite mantém a mãe em termoneutralidade, substituindo a ação termogênica do TAM neste período (CANNON; NEDERGAARD, 2004). O tamanho do TAM pode ser afetado pelo seu metabolismo, um processo regulado pela atividade autonômica simpática. Em situação de termogênese ativa no TAM ocorre aumento no número de células, acompanhado de menor acúmulo de gordura intracelular (LEITNER; BARTNESS, 2009). Apesar de não encontrarmos diferenças em relação a proliferação do TAM, qualitativamente nós observamos que o TAM de Mães-NR apresentaram menor acúmulo de gordura intracelular, sugerindo maior atividade termogênica.

Outros órgãos e tecidos sofrem marcantes alterações funcionais e morfológicas durante a lactação, dentre os quais o fígado. Na fase da lactação ocorre hipertrofia de vários órgãos, como o fígado que pode aumentar em até 50% o seu peso nesta fase, devido ao aumento na demanda da metabolização de nutrientes devido ao aumento do consumo alimentar (PRIEGO et al., 2013; BRADBURY, 2006). Como descreve Williamson (1980), juntamente com o aumento do peso na lactação pode ocorrer o acúmulo de triglicerídeos no fígado, com risco à esteatose, porém na análise qualitativa não foi evidenciado depósitos de gordura no fígado das mães. Conforme demonstraram nossos dados, Mães-NR apresentaram

menor peso do fígado acompanhado de maior número de hepatócitos em relação as Mães-NN. Até o presente momento não existem estudos que demonstrem este aspecto do fígado em mães submetidas à redução de ninhada. Assim, é provável que diante do menor consumo alimentar, associado à menor demanda metabólica hepática o fígado possa elevar o número de células em Mães-NR.

A insulina está entre os hormônios que oscilam seus níveis e ação durante a lactação (NEVILLE; MCFADDEN; FORSYTH, 2002). Como descreve Burnol e colaboradores (1986), o pâncreas materno diminui de tamanho durante a lactação, devido à redução da atividade secretória das células β -pancreáticas. Nosso estudo não encontrou alterações no peso do pâncreas ou área das ilhotas pancreáticas ao longo da lactação em ambos os grupos. Todavia, Mães-NR tem a área das ilhotas menor em relação a Mães-NN. Em estudo com mães submetidas à redução de ninhada Cancian (2014) observou redução na área de ilhotas pancreáticas no 21º dia da lactação. Nosso estudo não confirma estes dados, mas demonstra que esta redução pode ocorrer em etapas ainda mais precoces da lactação, 7º e 14º dias. Entre as diferentes adaptações metabólicas necessárias a lactação, mudanças na ação e secreção de insulina são bastante evidentes. De acordo com o estudo de Reaven e colaboradores (1988), a área de ilhotas está diretamente relacionada à secreção de insulina. Assim, é provável que a redução do tamanho das ilhotas pancreáticas em Mães-NR possa promover redução dos níveis de insulina.

No período da lactação as mães apresentam aumento na gliconeogênese hepática, processo de síntese de glicose, concomitantemente à redução dos níveis de insulina e diminuição da utilização de glicose por outros tecidos, o que ocasiona aumento da glicemia para assegurar maior quantidade ao cérebro e glândula mamária, para a síntese de lactose no leite (RUDOLPH et al. 2007; SANCHEZ-MUNIZ et al., 2012). Pode ser sugerido também que ocorra a redução na utilização de glicose para síntese de lactose, principal carboidrato do leite materno, sendo que o estímulo à captação de glicose para a glândula mamária e posterior síntese de lactose é mediado pela prolactina (GRONER, 2002). Assim pode ser explicado o resultado obtido de aumento na glicemia em Mães-NR no 14º e 21º dias da lactação, corrobora resultados de Cancian (2014), no qual foi evidenciado aumento da glicemia no 21º dia da lactação. No mesmo estudo de Cancian (2014) e de Neville,

McFadden e Forsyth (2002) foi observado o aumento da trigliceridemia em Mães-NR no fim da lactação. Estes resultados não foram confirmados em nosso estudo.

O estado metabólico materno pode refletir na composição do leite, assim nosso estudo avaliou a composição do leite materno, bem como, a morfologia da GM. O leite sendo composto por proteínas, carboidratos e lipídeos em distintas concentrações possui um conteúdo energético responsável pela ideal nutrição da prole. O triglicerídeo é o principal lipídeo do leite materno e importante representante energético (ASSUMPÇÃO et al., 2004). Ao longo das 3 etapas da lactação avaliadas foram observados em nosso estudo uma elevação no valor energético do leite de Mães-NR primariamente representado por maior teor de gordura neste leite em relação ao leite de Mães-NN. Estes nossos resultados confirmam estudos de Cancian (2014) e Nogueira Neto (2008), com roedores ao desmame que apresentaram aumento de conteúdo de energético e de gordura. Adicionalmente, pela primeira vez nós também observamos a redução de proteínas no leite de Mães-NR no 21º dia da lactação. A concentração de glicose no leite não foi afetada significativamente ao longo da lactação. Este dado não exclui alterações na composição de carboidratos do leite visto que conforme Groner (2002), a lactose é o principal carboidrato do leite.

A morfologia da GM em Mães-NR mostra evidente alteração no desenvolvimento, caracterizado pelo menor tamanho alveolar e acúmulo de adipócitos. Segundo estudo de Carré e Binart (2014), a redução na sucção de leite promove menor estímulo mamário e conseqüentemente favorece a inativação de ácinos na glândula mamária, caracterizado pela substituição da porção dos ácinos por adipócitos. Adicionalmente, o aumento de adipócitos na glândula mamária pode ser atribuído também ao excesso de TAB encontrado em mães submetidas à redução de ninhada, conforme descreve Neville e colaboradores (2012).

Os filhotes de ninhada reduzida encontram-se em estado de hipernutrição precoce que repercute em alterações biométricas e metabólicas evidenciadas já no período lactacional. O aumento significativo de peso corporal de Filhotes-NR na lactação observados em nossa pesquisa confirmam os achados por Faust e colaboradores (1980), Plagemann e colaboradores (1992), Thole e colaboradores (2012) e Fischer (2014). Os resultados também corroboram outras pesquisas que apontam que a redução de ninhada ao 3º dia de vida da prole está ligada ao

sobrepeso dos filhotes hipernutridos (CUNHA, 2007; RODRIGUES et al., 2009; NERY et al., 2011; RINALDI et al., 2012; THOLE et al., 2012; FISCHER, 2014).

O aumento de peso de Filhotes-NR no período da lactação está relacionado à maior disponibilidade de leite materno, de forma que os mesmos ingerem a quantidade máxima suportada pelo trato gastrointestinal pois ainda não há maturação do hipotálamo, o qual é responsável pelo controle alimentar. Esse estado de hipernutrição precoce com imaturidade hipotalâmica induz programação metabólica na prole (BOURET; SIMERLY, 2007; RINALDI et al., 2012). Adicionalmente, o aumento de peso nos Filhotes-NR no 14º e 21º dias da lactação pode estar relacionado ao maior teor calórico do leite, resultados similares foram obtidos por Nogueira Neto (2008), que justifica o achado pelo maior consumo de leite hipercalórico pela prole.

Além do aumento de peso corporal Filhotes-NR apresentam maior tamanho corporal ao 14º e 21º dias da lactação conforme dados do CNA, resultando em obesidade, conforme demonstra o Índice de Lee. Resultados confirmados por Frankenfeld (2009) usando mesmo modelo experimental. Estes dados confirmam que a hipernutrição lactacional rompe a homeostase energética precocemente e altera o controle do peso corporal, o que tem papel central na programação metabólica e a condição de saúde no futuro.

Os 14 primeiros dias pós-natais do rato é um período importante para o desenvolvimento cerebral (CASTRO, 2006). Nossos dados mostram redução do tamanho do cérebro na prole ao longo da lactação. Interessantemente, o cérebro em Filhotes-NR é menor que em animais de ninhada normal, sugerindo impacto sobre o desenvolvimento do SNC. Estudos tem demonstrado que áreas hipotalâmicas são afetadas na prole oriunda de ninhada reduzida (ZHANG; ZHANG; WANG, 2011).

Nosso estudo ainda encontrou aumento significativo do peso de estômago dos Filhotes-NR ao 14º dia de lactação, provavelmente relacionado à maior ingestão de leite dos filhotes neste período em que ainda não há maturação hipotalâmica que promove o controle alimentar (MACMILLEN; ADAM; MÜHLHÄUSLER, 2005).

O aumento do peso da glândula adrenal nos Filhotes-NR e NN ao longo da lactação sugere que há um desenvolvimento maior no período pós-natal, porém em um estudo com animais hipernutridos na lactação foi demonstrado que estes têm uma rápida maturação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (BOULLU-CIOCCA,

2008). A diminuição significativa do peso da glândula em Filhotes-NR ao 7º e 21º dias da lactação indica que há comprometimento no desenvolvimento nestes animais, porém são necessárias pesquisas histológicas para identificar mudanças teciduais no córtex e medula adrenal.

Considerando a importância da condição materna para o estado da prole, nós também avaliamos o perfil plasmático dos filhotes ao longo da lactação, sendo que há elevação da glicemia, com paralela queda nos triglicerídeos plasmáticos em ambos os filhotes. Sugerindo que durante a progressão da lactação ocorre uma mudança do perfil metabólico da prole que passa dos lipídeos para os carboidratos. Todavia, em etapas precoces da lactação observamos que Filhotes-NR tem concentrações plasmáticas de glicose maiores que Filhotes-NN, sugerindo que a redução do número de filhotes pode comprometer a homeostase glicêmica, supostamente por alterações hormonais como insulina e corticosterona, podendo ser importante para a programação metabólica.

O TAM na prole é importante para a produção de calor ao corpo, porém filhotes provenientes de ninhada reduzida apresentam redução da termogênese (XIAO et al., 2007). Nós encontramos maior teor de TAM nos Filhotes-NR em etapas precoces da lactação, sem alteração de proliferação o que sugere maior deposição de gordura neste tecido. Confirmando nossa hipótese o teor de gordura armazenado nos adipócitos do TAM é maior nos Filhotes-NR nas 3 etapas avaliadas, e culmina com redução de proliferação aos 21 dias da lactação, sugerindo que a redução do número de filhotes reduz precocemente a termogênese no TAM. Este achado pode ser confirmado em estudo de Xiao e colaboradores (2007) que demonstraram que animais adultos oriundos de ninhada reduzida apresentam diminuição de UCP-1 no TAM, tanto em condições basais quanto estimulados, como na exposição ao frio. Os mesmos autores explicam que estes animais apresentam redução de receptores adrenérgicos que medeiam os estímulos ao TAM, diminuindo a termogênese, processo que os autores sugerem dar susceptibilidade à obesidade na vida adulta. Dados também obtidos por outros estudos em animais adultos oriundos de ninhada reduzida.

Em ambos os grupos o peso do pâncreas da prole se elevou durante as etapas da lactação, indicando que esta fase é crítica para a maturação deste órgão

em roedores. Conforme Berleze (2005), o pâncreas de roedores sofre remodelação durante os primeiros vinte dias após o nascimento.

O aumento de peso do pâncreas em Filhotes-NR ao 7º e 21º dias da lactação, sem alteração na área das ilhotas pancreáticas sugere que há maior desenvolvimento da parte exócrina do pâncreas nestes animais. Todavia nós não avaliamos o número total de ilhotas, o que seria um indicativo mais adequado da proliferação do componente endócrino do órgão, considerando que diferentes dados da literatura mostram alterações histomorfológicas no pâncreas endócrino de animais de ninhada reduzida, como hipertrofia de ilhotas pancreáticas, ao desmame – após o 21º dia da lactação – e na fase adulta (LEITE; NETO, 2009; SLAVIN et al., 2010; THOLE et al., 2012; FISCHER, 2014).

Considerando os resultados discutidos nesta seção é evidente a precocidade e dimensão das alterações que ocorrem na mãe e repercutem na prole durante a lactação pela redução de ninhada imposta, de modo que, são observadas mudanças biométricas, metabólicas e teciduais nesta fase crítica do desenvolvimento, caracterizando a indução da programação metabólica.

7 CONCLUSÃO

A redução do número de filhotes da ninhada promoveu alterações na morfofisiologia materna evidentes nas diferentes etapas da lactação, dentre as quais destacaram-se:

- i) Redução do consumo alimentar e maior conteúdo de tecido adiposo branco;
- ii) Elevação da glicemia plasmática, acompanhada de maior proliferação hepática;
- iii) Modificações morfológicas da glândula mamária, com evidente grau de involução do tecido mamário, caracterizada pelo menor desenvolvimento dos ácinos mamários e evidente acúmulo de adipócitos entre o tecido mamário resultando em leite de elevado teor calórico.

A condição materna refletiu no crescimento, morfologia e metabolismo da prole, deste modo, filhotes lactentes de ninhada reduzida apresentaram:

- i) Elevação do peso corporal e obesidade com menor desenvolvimento da glândula adrenal ao longo da lactação;
- ii) Acelerado crescimento corporal, acompanhado de menor peso do cérebro nas três etapas lactacionais;
- iii) Elevação das concentrações plasmáticas de glicose e proteínas.

Finalmente, algumas adaptações fisiológicas e morfológicas da prole parecem ser inerentes a progressão da lactação e independe do número de filhotes, evidenciando-se:

- i) Aceleração do crescimento corporal, acompanhado de maior desenvolvimento de órgãos como pâncreas e adrenal e redução do crescimento cerebral;
- ii) Metabolicamente, redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos e com paralela elevação das concentrações de glicose circulantes.

REFERÊNCIAS

ACHARD, V. et al. Perinatal programming of central obesity and the metabolic syndrome: role of glucocorticoids. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v.4, n.2, p. 129-137, 2006.

ADAMS, L. A. et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. **Gastroenterology**, v.129, p. 113-121, 2005.

ANDERSON, S. M. et al. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis. **Breast Cancer Research**, v.9, n.1, p. 204-207, 2007.

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.

BALABAN, G.; SILVA, G. A. Efeito protetor do aleitamento materno contra a obesidade infantil. **Journal of Pediatrics**, v.80, n.1, p. 7-16, 2004.

BARKER, D. Obesity and Early Life. **Obesity Reviews**, v.8, Suppl.1, p.45-49, 2007.

BARTOL, F. et al. Lactocrine signaling and developmental programming. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 2, p. 696-705, 2013.

BASTARD, J. P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation and insulin resistance. **European Cytokine Network**, v.17, n.1, p.4-12, 2006.

BATESON, P. et al. Developmental plasticity and human health. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 419-421, 2004.

BERLEZE, K. J. **Efeitos de diferentes dietas sobre o metabolismo de lipídeos e de carboidratos em ratas normonutridas e desnutridas**. Porto Alegre, 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BERNARDIS, L.; PATTERSON, B. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v.40, n.4, p.527-528, 1968.

BOGUSZEWSKI, C. L.; PAZ-FILHO, G.; VELLOSO, L. A. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. **Endokrynologia Polska**, v.61, n.2, p.194-206, 2010.

BOULLU-CIOCCA, S. et al. Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood. **Diabetes**, v.57, n.3, p.669-677, 2008.

BOURET, S. G. Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 48, Suppl. 1, p. 31-38, 2009.

BOURET, S. G.; SIMERLY, R. B. Developmental of leptin-sensitive circuits. **Journal of Neuroendocrinology**, v.19, n.8, p.575-582, 2007.

BRADBURY, M. W. Lipid metabolism and liver inflammation. I Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.290, p.6194-6198, 2006.

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

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. E537-541, 1986.

CANCIAN, C. R. C. **A manipulação da prole durante o período lactacional modifica a morfofisiologia materna**. Ponta Grossa, 2014. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

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**, n.97, p.16-21, 2014.

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

CASTRO, V. L. Estudo Experimental em Ratos da Interação Mãe-filhote Expostos a Agroquímicos. **Circular Técnica**, n.13, 2006.

CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JUNIOR, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolologia**, v.50, n.2, p.190-197, 2006.

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.

CLAIN, D. J.; LEFKOWITCH J. H. Fatty liver disease in morbidly obesity. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.16, p. 239-252, 1987.

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.

CONCEIÇÃO, E. P. et al. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition-role of insulin resistance. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24, n.1, p.81-87, 2013.

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

COTTRELL, E. C.; OZANNE, S. E. Development programming of energy balance and the metabolic syndrome. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.66, n.2, p.198-206, 2007.

CUI, J. et al. Effects of leptin infusion during peak lactation on food intake, body composition, litter growth, and maternal neuroendocrine status in female Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, n.300, p.447–459, 2011.

CUNHA, A. C. D. S. R. **Influência da hiperalimentação na lactação sobre o processo de estímulo-secreção de insulina in vitro**. 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

CYPESS, A. M. et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. **The New England Journal of Medicine**, v.360, n.15, p.1509-1517, 2010.

DAVIDOWA, H.; LI, Y.; PLAGEMANN, A. Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons of normal and postnatal overnourished rats differ in their responses to melanin-concentrating hormone. **Regulatory Peptides**, v.108, n.2, p.103-111, 2002.

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.

DÖRNER, G.; PLAGEMANN, A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. **Hormone and Metabolic Research**, n.26, p.213–221, 1994.

DYER, J. S.; ROSENFELD, C. R. Metabolic imprinting by prenatal, perinatal, and postnatal overnutrition: a review. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.29, n.3, p.266-276, 2011.

FARMER, S. R. Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. **Genes and Development**, v.22, n.10, p.269-75, 2008.

FAUST, I. M.; JOHNSON, P. R.; HIRSCH, J. Long-term effects of early nutritional experience on the development of obesity in the rat. **The Journal of Nutrition**, v.110, n.10, p.2027-2034, 1980.

FESTI, D. et al. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. **Obesity Reviews**, v. 5, p. 27-42, 2004.

FISCHER, S. V. **O exercício físico e o controle secretor de insulina na obesidade induzida por marcação metabólica.** Ponta Grossa, 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

FLINT, D. J. et al. Effects of growth hormone and prolactin on adipose tissue development and function. **Pituitary**, v.6, p.97-102, 2003.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, p.S.192-203, 2007.

FRANCO, J. G. et al. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. **The Journal of Physiology**, n.590, p.5503-5518, 2012.

FRANKENFELD, S. P. **Efeitos do treinamento em esteira em ratos obesos programados pela superalimentação pós-natal.** 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

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

GAMO, Y. et al. Limits to sustained energy intake. XX. Body temperatures and physical activity of female mice during lactation. **The Journal of Experimental Biology**, n.216, p.3751-3761, 2013.

GAROFANO, A.; CZERNICHOW, P.; BREANT, B. Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. **Diabetologia**, v.41, n.9, p.1114-1120, 1998.

GITTES, G. K.; PRASADAN, K.; TULACHAN, S. Pancreas and islet development. **Stem Cell Therapy for Diabetes**, p.3-40, 2010.

GOTTLIE, M. G. V. et al. Aspectos genéticos do envelhecimento e doenças associadas: uma complexa rede de interações entre genes e ambiente. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v.10, n.3, 2007.

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

GRINO, M. Prenatal nutritional programming of central obesity and the metabolic syndrome: role of adipose tissue glucocorticoid metabolism. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n.5, p.1233-1235, 2005.

GRONER, B. Transcription factor regulation in mammary epithelial cells. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.25-32, 2002.

GROVE, K. L. et al. Development of metabolic systems. **Physiology and Behavior**, v.86, n.5, p.646-660, 2005.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte effects of nutritional programming during prenatal and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, n.5, p.367-377, 2008.

GUILLOTEAU, P. et al. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.60, Suppl.3, p.17-35, 2009.

GUPTE, P. et al. Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.19, p. 854-8, 2004.

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.

HAMOSH, M. Bioactive factors in human milk. **Pediatric Clinics of North America**, v.48, n.1, p.69-86, 2001.

HANLEY, B. et al. Metabolic imprinting, programming and epigenetics – a review of present priorities and future opportunities. **British Journal of Nutrition**, v.104, nS1, p.S1-S25, 2010.

HARDER, T. et al. Overweight and increased diabetes susceptibility in neonatally insulin-treated adult rats. **Endocrine Regulations**, v.33, n.1, p.25-31, 1999.

HAVEL, P. J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. **Diabetes**, v.53, Suppl. 1, p.S143-51, 2004.

HEIDEL, E.; PLAGEMANN, A.; DAVIDOWA, H. Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. **Neuroreport**, n.10, p.1827-1831, 1999.

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.32598, 2012.

HIRAI, C. et al. Trophic effect of multiple growth factors in amniotic fluid or human milk on cultured human fetal small intestinal cells. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, n.34, p.524-528, 2002.

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

HOUP, K. A.; EPSTEIN, A. N. Ontogeny of controls of food intake in the rat: GI fill and glucoprivation. **Journal of Physiology**, n.225, p.58-66, 1973.

HUANG, S.; CZECH, M. P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metabolism**, v.5, n.4, p.237-252, 2007.

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

KARGAR, C.; KTORZA, A. Anatomical versus functional β -cell mass in experimental diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.10, Suppl.4, p.43-53, 2008.

KENNEDY, G. C. 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 and Metabolism**, v. 89, n. 6, p.2548-2556, 2004.

KING, J. C. Maternal obesity, metabolism and pregnancy outcomes. **Annual Reviews of Nutrition**, v.26, p.271-291, 2006.

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

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.

KRÓL, E.; JOHNSON, M. S.; SPEAKMAN, J. R. Limits to sustained energy intake VIII. Resting metabolic rate and organ morphology of laboratory mice lactating at Thermoneutrality. **The Journal of Experimental Biology**, n.206, p.4283-4291, 2003.

LEIBIGER, I. B.; LEIBIGER, B.; BERGGREN, P. O. Insulin signaling in the pancreatic β -cell. **Annual Review of Nutrition**, v.28, p.233-251, 2008.

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.

LEITE, L.; NETO, J. Integração Neuroendócrina na Regulação da Ingestão Alimentar. **Neurobiologia**, v.72, n.2, 2009.

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

LEVIN, B. E. Metabolic imprinting on genetically predisposed neural circuits perpetuates obesity. **Nutrition**, v.16, n.10, p.909-915, 2000a.

_____. The obesity epidemic: metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits. **Obesity Research**, v.8, n.4, p.342-347, 2000b.

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

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.

MARTINEZ, J. A. Body-weight regulation: causes of obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.59, n.3, p.337-345, 2000.

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.

MATHERS, J. C.; MCKAY, J. A. Epigenetics – potencial contribution to fetal programming. **Advances in Experimental Medicine Biology**, n.646, p.119-123, 2009.

MCMILLEN, I. C.; ADAM, C. L.; MÜHLHÄUSLER, B. S. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. **Journal of Physiology**, n.565, p.9-17, 2005.

MORAG, M.; POPLIKER, F.; YAGIL R. Effect of litter size on milk yield in the rat. **Laboratory Animals**, n.9, p.43-47, 1975.

MOURA, V.; MONTEIRO, R. Papel do Tecido Adiposo na Inflamação e Metabolismo do Doente Obeso. **Revista da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação**, v. 16, n.1, p.15-22, 2010.

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

NERY, C. D. S. et al. Medidas Murinométricas e Eficiência Alimentar em Ratos Provenientes de Ninhada Reduzidas na Lactação e Submetidos ou não ao Exercício de Natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.17, n.1, p.49-55, 2011.

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**, n.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.

NOGUEIRA NETO, J. F. **Programação Neonatal do Perfil Lipídico em Ratos e Ovelhas**. Rio de Janeiro, 2008. 90 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

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.

OLIVER-KRASINSKI, J. M.; STOFFERS, D. A. On the origin of the beta cell. **Gene and Developmental**, v. 22, n. 15, p.1998-2021, 2008.

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

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.

PLAGEMANN, A. et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v.99, n.3, p.154-158, 1992.

_____ et al. Reduction of cholecystokinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overdeed weanling rats. **Neuroscience Letters**, v.258, n.1, p.13-16, 1998.

_____ et al. Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. **Brain Research**, n.818, p.160-163, 1999a.

_____ 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, 1999b.

_____ 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**, n.836, p.146–155, 1999c.

POZZO MILLER, L. D.; AOKI, A. Postnatal development of the hypothalamic ventromedial nucleus: neurons and synapses. **Cellular and Molecular Neurobiology**, n.12, p.121-129, 1992.

PRIEGO, T. et al. Maternal Dietary Fat Affects Milk Fatty Acid Profile and Impacts on Weight Gain and Thermogenic Capacity of Suckling Rats. **Lipids**, v.48, n.5, p.481-495, 2013.

QUEIROZ, J. C. F. et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, n.5, p.582-594, 2009.

RAMALHO, R.; GUIMARÃES, C. Papel do Tecido Adiposo e dos Macrófagos no Estado de Inflamação crônica associada à obesidade: implicações clínicas. **Acta Médica Portuguesa**, v.21, n.5, p.489-496, 2008.

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

REMACLE, C. et al. Intrauterine programming of the endocrine pancreas. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.9, Suppl. 2, p.196-209, 2007.

RINALDI, W. et al. Efeito da redução de ninhada sobre as respostas autonômicas e metabólicas de ratos Wistar. **Revista de Nutrição**, v.25, n.3, p.321-330, 2012.

RODRIGUES, A. L. et al. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. **Journal of Endocrinology**, v.195, n.3, p.485-494, 2007.

_____ et al. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. **Journal of Physiology**, v.587, n.11, p.2647-2661, 2009.

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.

SLAVIN, B. G. et al. Histological, immunocytochemical, and morphometrical analyses of pancreatic islets in the BSB mouse model of obesity. **The Anatomical Record**, v.293, n.1, p.108-116, 2010.

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.

SAGAWA, N. et al. Role of leptin in pregnancy: a review. **Placenta**, v.23, p.S80-S86, 2002.

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.

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, 2014.

SMORLESI, A. et al. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. **Obesity Reviews**, v.13, Suppl. 2, p.83–96, 2012.

STEINER, D. J. et al. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. **Islets**, v.2, n.3, p.135-145, 2010.

SULLIVAN, E. L. Maternal high fat diet programming of the endocrine system. **Journal of Physiology**, v.590, p.5267–5268, 2012.

SULLIVAN, E. L.; GROVE, K. L. Metabolic Imprinting of Obesity. **Forum of Nutrition**, v.63, p.186–194, 2010.

SULLIVAN, E. L.; SMITH, M. S.; GROVE, K. L. Perinatal Exposure to High-Fat Diet Programs Energy Balance, Metabolism and Behavior in Adulthood. **Neuroendocrinology**, v.93, n.1, p.1–8. 2011.

TAYLOR, P.; POSTON, L. Development programming of obesity in mammals. **Experimental Physiology**, v.92, n.2, p.287-298, 2007.

THOLE, A. et al. Progenitor cells and TNF-alpha involvement during morphological changes in pancreatic islets of obese mice. **Tissue Cell**, v.44, n.4, p.238-248, 2012.

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.

VERNON, R. G.; FLINT, D. J. Control of fatty acid synthesis in lactation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.42, p.315-331, 1983.

VERNON, R. G.; POND C. M. Adaptations of maternal adipose tissue to lactation. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.2, n.3, p.231-241, 1997.

WAGNER, C. L. Amniotic fluid and human milk: a continuum of effect? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.34, n.5, 513-514, 2002.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and Visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocrine Reviews**, v.21, n.6, p.697-738, 2000.

WALL, E. H.; MCFADDEN, T. B. A local affair: How the mammary gland adapts to changes in milking frequency. **Journal of Animal Science**, n.90, p.1695–1707, 2012.

WATERLAND, R. A.; GARZA C. Potencial 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.

WELLS, J. C. Flaws in the theory of predictive adaptive responses. **Trends Endocrinol Metab.**, v.18, n.9, p.331-337, 2007.

WILLIAMS, G. L. et al. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, p. 1-11, 2002.

WILLIAMSON, D. H. Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. **FEBS Letters**, v.117, 1980.

WOODSIDE, B.; ABIZAID, A.; WALKER, C. Changes in leptin levels during lactation: implications for lactational hyperphagia and anovulation. **Hormones and Behavior**, v.37, n.4, p.353-365, 2000.

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, 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.

YOSHIOKA, K.; YOSHIDA, T.; KONDO, M. Reduced brown adipose tissue thermogenesis and metabolic rate in pre-obese mice treated with monosodium-L-glutamate. **Endocrinologia Japonica**, v.38, n.1, p.75-79, 1991.

ZHANG, X.; ZHANG, Q.; WANG, D. Litter size Variation in Hypothalamic Gene Expression Determines Adult Metabolic Phenotype in Brandt's Voles. **PLoS One**, v.6, n.5, p.e19913, 2011.

ZHAO, Z. et al. Limits to sustained energy intake. XVIII. Energy intake and reproductive output during lactation in Swiss mice raising small litters. **The Journal of Experimental Biology**, n.216, p.2349-2358, 2013.

ANEXO A

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL***Ass
28/06/14***CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 033/2014**

Protocolo UEPG –9895/2014

Título – Projeto de pesquisa “O impacto da redução de ninhada durante o período lactacional sobre a morfofisiologia materna e sua repercussão na prole”**Data de Entrada** – 27/06/2014**Resultado:** Aprovado**Data/Prazo** – 27/06/2014 a 27/06/2016**Considerações**

Prezada Profa Dra Sabrina Grassioli e mestrando João Lucas de Paula Xavier:

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, do uso de 112 (cento e doze) ratos, sendo 25 (vinte e cinco) machos e 84 (oitenta e quatro) fêmeas.

- APROVADO.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROESP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais*Profª. Dra. Maria Marta Lodi*
CoordenadoraAv. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264