



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E
EXPERIMENTAL – FISCLINEX

JOSÉ FIRMINO NOGUEIRA NETO

Programação neonatal do perfil lipídico em ratos
e ovelhas



RIO DE JANEIRO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E
EXPERIMENTAL – FISCLINEX

Programação neonatal do perfil lipídico em ratos e ovelhas

Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e
Experimental da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade do Estado do Rio de
Janeiro para obtenção do grau de Doutor em
Ciências



RIO DE JANEIRO

2008



CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E
EXPERIMENTAL – FISCLINEX

Programação neonatal do perfil lipídico em ratos
e ovelhas

ORIENTADORES:

Dr. EGBERTO GASPAR DE MOURA

Prof. Titular do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia
Roberto Alcântara Gomes, UERJ.

Dr. RUY GARCIA MARQUES

Prof. Adjunto do Departamento de Cirurgia Gera I, Faculdade de Ciências
Médicas, UERJ

Banca examinadora:

Efetivos:

Prof^a. Dr^a. Karen de Jesus Oliveira e Sanchez (UFF)
Prof. Dr. Jorge Reis de Almeida (Hospital dos Servidores do Estado)
Prof. Dr. Marco Aurélio Rodrigues (UERJ)
Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura (UERJ)
Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias (UEM)

Suplentes:

Prof^a. Dr^a. Carmen Cabanelas Pazos de Moura (UFRJ)
Prof^a. Dr^a. Patrícia Cristina Lisboa (UERJ)

Revisão:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Cristina Lisboa (UERJ)

RIO DE JANEIRO
2008

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/ BIBLIOTECA CB/A

N778 Nogueira Neto, José Firmino.
Programação neonatal do perfil lipídico em ratos e ovelhas/ José
Firmino Nogueira Neto. – 2008.
xiv,90f. : il.

Orientador : Egberto Gaspar de Moura, Ruy Garcia Marques.

Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Médicas.

Bibliografia : f. 68-90.

1. Nutrição - Teses. 2. Lipídios - Teses. 3. Corpo - Peso - Teses.
4. Denutrição - Teses. 5. Lactação - Teses. I. Moura, Egberto Gaspar
de. II. Marques, Ruy Garcia. III. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 612.39

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Endócrina do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes e no Laboratório de Lípidos – LabLip, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob orientação dos Professores **Dr. EGBERTO GASPAR DE MOURA** e **Dr. RUY GARCIA MARQUES** e, contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (**FAPERJ**).

"Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor."

Goethe

Dedico esta Tese aos meus pais, Francisco Firmino Lima e Solimar Alencar Lima, (*in memoriam*) minha primeira professora, pelo exemplo e pela presença incentivadora, sempre ensinando a me conduzir com retidão pelos caminhos da vida.

Em especial, a Célia, minha mulher, companheira de todas as horas, pela compreensão, apoio e paz, necessária ao ser humano a atingir seus objetivos.

Às minhas filhas, Lívia e Silvia, pela tranquilidade que me ofertam, sabendo trilhar com responsabilidade as suas existências.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Egberto Gaspar de Moura, pela confiança que me foi depositada, por sua amizade, estímulo, dedicação e, sobretudo, pela oportunidade de realizar este trabalho em conjunto, no qual, durante a sua orientação, tive o privilégio de tão importante aprendizado.

Ao Professor Ruy Garcia Marques, pelo apoio em todos os momentos dos longos anos do nosso convívio acadêmico e pessoal, compartilhando sua experiência do Laboratório de Cirurgia Experimental com as nossas atividades laboratoriais e docentes.

À Professora Patrícia Cristina Lisboa, pela leitura e revisão de todo este trabalho, além da sua presença constante, incentivando, colaborando e mostrando a importância do trabalho em equipe, em prol da produção científica com qualidade.

À Professora Magna Cottini da Fonseca Passos, pela sua dedicação ao Laboratório de Fisiologia Endócrina, promovendo a participação dos alunos nos trabalhos científicos.

À Professora Carmen Cabanelas Pazos de Moura, pela parceria em experimentos nos quais realizamos os procedimentos técnicos, demonstrando confiança e reconhecimento nas nossas atividades laboratoriais.

Aos professores componentes da banca examinadora, por aceitar o convite para avaliação deste trabalho.

Ao Dr. Alexandre Cardoso, Dra. Nilcéia Freire, Dr. Ronaldo Martins Lauria, Dr. Ayrton Pires Brandão e Dr. Denílson Campos de Albuquerque, por terem me ajudado a realizar o sonho, de termos na UERJ um Laboratório Clínico voltado exclusivamente para a pesquisa e para a produção científica.

A todos os alunos, funcionários e técnicos do Laboratório de Fisiologia Endócrina do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela participação em conjunto nos vários modelos experimentais e, em especial, aos meus colaboradores mais diretos nesta Tese: Aline Fagundes, Ananda Rodrigues, Elaine de Oliveira, Fabiane Toste, Isabela Bonomo, Isis Trevenzoli e José Ricardo de Souza.

À Amélia Gomes, pelo desempenho de suas funções na secretaria da pós - graduação, sempre com atenção, compreensão e espírito fraterno com todos os alunos.

Ao Professor Jerzy Alfred Sturm, pela acolhida quando da minha chegada ao Serviço do Laboratório Central e de Urgências do Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE, contribuindo para um aprendizado voltado para o aperfeiçoamento no Laboratório Clínico e para a minha inserção nas pesquisas laboratoriais.

A todos os funcionários, técnicos, alunos, estagiários e colegas do Laboratório Central e de Urgências do HUPE, por participarem do meu aprimoramento na área das análises clínicas.

Aos meus colaboradores do Laboratório de Lípidos – LabLip, Ana Maria Bastos Coutinho, Antonio Carlos Macedo de Sá, Edson Roberto Alves de Oliveira e Vânia Penha Pinto, pela grande e inestimável participação em toda a execução técnica deste trabalho, bem como pela paciência e compreensão que me dispensam em todos os momentos do nosso dia-a-dia laboratorial.

Aos meus familiares, de modo especial aos meus irmãos, Maria de Jesus, Francisco Firmino, Maria Solimar e Marcos Vinicius, pelo apoio e carinho que sempre me dedicam em nossos encontros.

A todos meus amigos, que de maneira muito afetiva, durante o nosso convívio, me concedem momentos de muita felicidade.

Finalmente a DEUS, por permitir que eu permaneça na fé, não me afastando dos preceitos éticos, morais e religiosos.

A todos, meu muito obrigado.

ÍNDICE

	Página
Índice	x
Lista de abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
Introdução	1
Objetivos	17
Materiais e Métodos	18
Resultados	27
Discussão	53
Conclusões	67
Referências Bibliográficas	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGLs	Ácidos Graxos Livres
AKT	Proteína quinase B
apoE	Apolipoproteína E
ATP	Adenosina trifosfato
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
D1	Desiodase tipo I
D2	Desiodase tipo II
DCV	Doença cardiovascular
FSH	Hormônio folículo estimulante
GH	Hormônio do crescimento (growth hormone)
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
GPDm	Glicerofosfato desidrogenase mitocondrial
HDLc	Lipoproteína de alta densidade colesterol (<i>high density lipoprotein cholesterol</i>)
HOMA	Modelo de avaliação da homeostase
HT	Hormônio tireóideo
IR	Receptor de insulina (insulin receptor)
IRI	Índice de resistência à insulina
IRS 1	Substrato 1 do receptor de insulina
JAK2	Janus quinase do tipo 2
LDLc	Lipoproteína e baixa densidade colesterol (<i>low density lipoprotein cholesterol</i>)
LH	Hormônio luteinizante
LPL	Lipoproteína lipase
MCH	Hormônio concentrador de melanina
MCT	Massa corporal total
MC	massa corporal
MGV	Massa de gordura visceral
NPY	Neuropeptídeo Y
PI3K	Fosfoinositol 3-cinase
PRL	Prolactina

RIE	Radioimunoensaio
RNA _m	mensageiro do ácido ribonucléico
STAT	transdutor do sinal e ativadores da transcrição 3
T ₃	Triiodotironina
T ₄	Tiroxina
TAM	Tecido adiposo marrom
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina (<i>thyrotropin releasing hormone</i>)
TSH	Hormônio tireotrófico (<i>thyroid stimulating hormone</i>)
VLDL _c	Lipoproteína de muito baixa densidade colesterol (<i>very low density lipoprotein cholesterol</i>)

RESUMO

A nutrição na lactação é um importante fator de impressão para futuras alterações hormonais e metabólicas no desenvolvimento, que vai regular a composição corporal, a homeostase glicêmica e o perfil hormonal dos animais, caracterizando o processo de programação. Nesta etapa crítica da vida, a desnutrição ou o excesso de nutrientes modificam a secreção e ação de vários hormônios, especialmente a prolactina, leptina e hormônios tireóideos. Apesar dos diversos estudos epidemiológicos mostrando que o perfil lipídico pode ser programado por alterações nutricionais na gestação e lactação, contribuindo para maior risco de doenças cardiovasculares, poucos estudos experimentais foram realizados. Assim, avaliamos a programação do perfil lipídico em diversos modelos de impressão nutricional e hormonal em ratos e ovelhas, relacionando a programação da massa e composição corporal e homeostase glicêmica. Estudamos seis modelos de programação, a saber: a) desnutrição protéica materna na lactação (dieta com 8% de proteína); b) bloqueio da prolactina no fim da lactação, com o uso de bromocriptina; c) supernutrição na lactação por redução da ninhada (3 vs. 10 filhotes); d) injeção de leptina aos filhotes (8 µg/100g peso corporal/dia, nos dez primeiros dias de lactação); e) exposição materna à nicotina (6 mg/kg de massa corporal/dia) na lactação; f) desnutrição protéica e calórica materna de ovelhas na lactação. Os ratos programados pela restrição protéica materna ganham menos massa corporal, menos gordura total e visceral, apresentam menor glicemia e insulinemia e a única alteração programada no perfil lipídico foi a menor concentração sérica de colesterol total (16%). Os ratos cuja prolactina materna foi bloqueada ganharam mais massa corporal, maior gordura total e visceral, apresentaram maior índice de resistência à insulina e menor adiponectinemia, que se refletiu em um perfil lipídico bastante alterado, com elevação do colesterol total (30%), LDLc (1,5X), VLDLc (46%), triglicerídeos (49%) e diminuição de HDLc (28%), com conseqüentes maiores índices de Castelli I (83%) e II (2X). Os ratos criados em ninhada reduzida apresentaram maior massa corporal, maior gordura total e visceral, sem alteração da homeostase glicêmica e inversão da relação albumina/globulina sérica, sugestiva de estado inflamatório e menor HDLc (6%). A hiperleptinemia neonatal fez com que os ratos ganhassem mais massa corporal, mas com redução da gordura visceral, hiperinsulinemia, hipoadiponectinemia (sugestivos de resistência à insulina) e a única alteração do perfil lipídico foi uma hipertrigliceridemia (37%). A exposição materna à nicotina programou para maior massa de gordura total e visceral, sem alterações de homeostase glicêmica ou perfil lipídico. Em ovelhas, a desnutrição protéica e calórica materna na lactação programou para menor ganho de massa corporal e menor HDLc (18 e 22%) em ambos os grupos desnutridos, porém com menor colesterol total (17%) e LDLc (5%) no grupo cuja mãe sofreu restrição protéica. Entre os seis modelos estudados, o bloqueio da prolactina é o que programou para alterações do perfil lipídico e da homeostase glicêmica mais compatíveis com a síndrome metabólica. A injeção de leptina programou para a elevação de triglicerídeos (um dos componentes da síndrome metabólica), enquanto a supernutrição neonatal e a administração de nicotina não produziram modificações importantes no perfil lipídico. A restrição protéica materna em ratos e ovelhas programou para menor concentração sérica de colesterol total, porém nas ovelhas, o HDLc sérico também foi menor. Assim, dependendo do modelo de impressão utilizado e da espécie estudada, o perfil lipídico pode ou não ser programado para alterações compatíveis com a síndrome metabólica.

ABSTRACT

Nutritional status on lactation is an important imprinting factor for future hormonal and metabolic changes during development, regulating body composition, glucose homeostasis and hormonal profile in animals, characterizing the programming effect. In this critical period of life, malnutrition or overnutrition changes the secretion and action of several hormones, such as prolactin, leptin and thyroid hormones. Although several epidemiologic studies confirm the programming effect upon the lipids profile in humans, caused by nutritional imprinting during gestation or lactation that can contribute to a higher risk of cardiovascular diseases, few experimental data was reported. Thus, our main objective was to study the lipid profile in several models of nutritional and hormonal imprinting in rats and ovine, related to the programming of body mass and composition and glucose homeostasis. We studied 6 models of programming: a) maternal protein malnutrition (8% protein); b) prolactin blockage at the end of lactation by bromocriptine c) early overnutrition on lactation by litter size reduction (3 vs. 10 pups); d) leptin injection to the pups (8 µg/100g body weight/day, for the first 10 days of lactation); e) maternal nicotine administration (6mg/Kg body mass/day) during lactation; f) ewes maternal protein (8%) or energie (60%) restriction during lactation. The programmed offspring whose mother were protein -restricted during lactation gain less body mass, and when they were 180 days -old, showed lower total and visceral fat mass, lower serum glucose and insulin and lower total cholesterol (-16%). The prolactin blockage programmed for higher body mass, total and visceral fat mass, higher insulin resistance index and lower serum adiponectin, these effects were associated to several changes in the lipid profile, such as higher total cholesterol (30%), LDL-c (1,5X), VDLc (46%), triglycerides (49%) and lower HDLc (28%), with consequent higher Castelli I (83%) and II (2X) index. The rats from small litter size showed higher body mass, total and visceral fat mass, but without changes in glucose homeostasis and lower albumin/globulin ratio, suggesting a higher inflammatory status and lower HDLc (6%). Leptin neonatal injection programmed for higher body mass, but lower visceral fat mass, hyperinsulinemia and hypoadiponectinaemia, suggesting insulin resistance, with hypertriglyceridemia (37%). Maternal nicotine exposure programmed for more total and visceral fat mass, with no changes in glucose homeostais or lipid profile. In ovines, maternal protein or energie restriction during lactation programmed for lower body mass and lower serum HDLc concentration (18 e 22%) in both malnourished groups. Protein -restricted group showed lower total serum cholesterol (17%) and LDLc (5%). Considering the 6 studied models, the prolactin blockage seems to be the one that produced the changes more compatible with the metabolic syndrome. Neonatal leptin injection only increased one the component of the metabolic syndrome (triglycerides), while early overnutrition or nicotine administration did not produce any important change related to the metabolic syndrome. Protein restriction in ovines and rodents programmed for lower total cholesterol, but the ovines showed also lower serum HDLc. In conclusion, the lipid profile can be programmed in different manner depending on the imprinting model and the specie studied.

INTRODUÇÃO

1 – Programação Metabólica

O termo programação metabólica é definido como um fenômeno biológico adaptativo que estabelece relações entre estímulos físico-químicos em períodos críticos no início da vida, como a gestação e/ou lactação, e estados funcionais durante o desenvolvimento (Lucas, 1994; Barker, 2003; De Moura & Passos, 2005). Alguns estudos mostraram que situações adversas que afetam o desenvolvimento, como desnutrição e alterações hormonais, em períodos críticos da vida, são capazes de influenciar permanentemente a estrutura e a fisiologia de órgãos e tecidos (Walker & Courtin, 1985; Pracyk *et al.*, 1992; Dorner & Plagemann, 1994; Godfrey & Robinson, 1998; Cravo *et al.*, 2002; Passos *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2003).

Um dos primeiros estudos a levantar esta hipótese foi realizado com recrutas que nasceram no período conhecido como a “fome holandesa”, na qual as mães sofreram restrição alimentar nos dois primeiros trimestres da gravidez, observando -se aumento na incidência de obesidade na idade adulta (Ravelli *et al.*, 1976). Dados similares foram descritos em estudos com animais desnutridos na gestação ou lactação (Jones & Friedman, 1982; Jones *et al.*, 1984; Anguita *et al.*, 1993; Passos *et al.*, 2000).

A lactação é um período crítico, onde há um importante desenvolvimento cognitivo e neurológico. Sugere-se que fatores ambientais adversos nesta fase da vida podem causar alterações fisiológicas, predispondo a gênese de doenças cardiovasculares e da Síndrome Metabólica (obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial e diabetes mellitus tipo 2) no adulto (Godfrey & Barker, 2000; Edwards *et al.*, 2001; Phillips, 2002; Jaquet, 2004).

1.1 – Programação Nutricional

Estudos epidemiológicos e experimentais mostram que a desnutrição na gestação e/ou lactação está associada ao desenvolvimento da obesidade na vida adulta (Hales, 1997; Godfrey & Robinson, 1998; Ravelli *et al.*, 1999; Velásquez-Melendez *et al.*, 1999; Godfrey & Barker, 2000; Sichieri *et al.*, 2000).

A desnutrição na gestação ou lactação pode ser responsável por modificações na homeostase glicêmica, como redução na secreção de insulina (Hales *et al.*, 1991; Desai & Hales, 1997; Moura *et al.*, 1997; Bertin *et al.*, 1999; Ozanne & Hales, 2002; Moura *et al.*, 2002; Benyshek *et al.*, 2004), aumento da sensibilidade à insulina, quando o animal é mais jovem (Moura *et al.*, 1997) e resistência a sua ação, quando se torna mais velho (Plaggeman, 2006), diminuição de células beta, menor conteúdo de insulina pancreática (Bertin *et al.*, 1999) e aumento da glicogenólise na vida adulta (Burns *et al.*, 1997).

O estado nutricional perinatal determina a capacidade do adipócito sintetizar leptina futuramente (McMillen *et al.*, 2006), já tendo sido demonstrado que indivíduos com baixo peso ao nascer apresentam hiperleptinemia quando adultos (Phillips *et al.*, 1999).

A desnutrição protéica materna na lactação é capaz de programar as concentrações séricas de leptina (Moura *et al.*, 2002), insulina (Vickers *et al.*, 2001a; Vickers *et al.*, 2001b; Fagundes *et al.*, 2007), corticosterona (Catalani *et al.*, 2000; Fagundes *et al.*, 2007) e hormônios tireóideos (Passos *et al.*, 2002; Dutra *et al.*, 2003) na idade adulta. No modelo de desnutrição na lactação desenvolvido em nosso laboratório, demonstrou-se que o estado nutricional materno programa o peso corporal, a função tireóidea e o metabolismo intermediário da prole adulta, como evidenciado nos quadros 1 e 2. Recentemente, em nosso laboratório, Fagundes *et al.* (2007), verificaram que a prole adulta de ratos Wistar, cujas mães sofreram restrição protéica, tiveram uma redução de 26% na insulina sérica e aumento de 90% na corticosterona sérica, confirmando o fenômeno da programação hormonal em modelo animal (Quadros 1 e 2).

Quadro 1. Dados da programação pela restrição protéica (RP) materna na lactação

Peso corporal	↓	Passos <i>et al.</i> , 2000
Gordura visceral e total	↓	Fagundes <i>et al.</i> , 2007
Catecolaminas	↑	
Corticosteronemia	↑	
Glicemia	↓	
Insulinemia	↓	
Leptinemia	=	Teixeira <i>et al.</i> , 2002
Efeito anorexigênico da leptina	↓	Passos <i>et al.</i> , 2004
Ob-Rb hipofisário	↑	Vicente <i>et al.</i> , 2004
RNA _m do GH	↓	De Moura <i>et al.</i> , 2007
T ₃ e T ₄ (totais e livres)	↑	Passos <i>et al.</i> , 2002; Dutra <i>et al.</i> , 2003; Lisboa <i>et al.</i> , 2008
TSH sérico	↓	
Captação de ¹²⁵ I	↑	
Atividade D1 hepática	↑	Dutra <i>et al.</i> , 2003
Atividade D2 hipofisária	↑	Lisboa <i>et al.</i> , 2008
Atividades D1 e D2 tireóidea	=	
Atividade D1 muscular	↑	
Atividade D2 muscular	↓	
Secreção de TSH pós-TRH <i>in vitro</i>	↓	
Atividade GPDm hepática	↑	

Quadro 2. Dados da programação pela restrição calórica (RC) materna na lactação

Peso corporal	↑	Passos <i>et al.</i> , 2000; Teixeira <i>et al.</i> , 2002
Leptinemia	=	Teixeira <i>et al.</i> , 2002
Efeito anorexigênico da leptina	↓	Passos <i>et al.</i> , 2004
Ob-Rb hipofisário	↑	Vicente <i>et al.</i> , 2004
RNA _m do GH	↑	De Moura <i>et al.</i> , 2007
T ₃ total	↑	Passos <i>et al.</i> , 2002; Dutra <i>et al.</i> , 2003
T ₄ total	=	
TSH sérico	↓	Dutra <i>et al.</i> , 2003
Captação de ¹²⁵ I	↑	Passos <i>et al.</i> , 2002
Atividade D1 hepática	↑	Dutra <i>et al.</i> , 2003

1.2 – Programação Hormonal

De acordo com Csaba (2000), a programação hormonal ocorre no período neonatal, quando há o amadurecimento dos receptores hormonais. Foi relatado que mudanças nas concentrações circulantes de hormônios tireóideos em ratos neonatos alteram permanentemente a sensibilidade do eixo hipotálamo -hipófise a estes hormônios (Walker & Courtin, 1985; Pracyk *et al.*, 1992; Moura *et al.*, 2008).

Os glicocorticóides são importantes reguladores do desenvolvimento e maturação de órgãos, porém a exposição fetal ao seu excesso produz menor crescimento, hipertensão arterial, hiperglicemia, maior atividade do eixo hipotálamo -hipófise-adrenal e ansiedade na prole adulta (Benediktsson *et al.*, 1993; Lindsay *et al.*, 1996; Welberg *et al.*, 2000). A administração perinatal de androgênios programa um padrão masculino de liberação de LH e FSH (Vom Saal & Bronson, 1980). A injeção de insulina em ratos neonatos é capaz de levar a obesidade na vida adulta (Dorner & Plagemenn, 1994).

A administração de leptina em ratas gestantes programa menor crescimento esquelético e adiposidade, sem alterar a ingestão alimentar da prole adulta (Nilsson *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que o tratamento neonatal com leptina em fêmeas reverte as alterações (obesidade, hiperinsulinemia e resistência à leptina) programadas pela desnutrição na gestação (Landt *et al.*, 1998; Smith & Waddell, 2003), enquanto que em machos resulta apenas em redução transitória do ganho de massa corporal (Vickers *et al.*, 2008), mostrando que o tratamento neonatal com leptina é capaz de conferir proteção contra o desenvolvimento do fenótipo metabólico programado. Tais evidências reforçam a importância da leptina na determinação da homeostase energética, além de sugerir que os efeitos da leptina são modulados pelo gênero assim como pelo estado nutricional pré e pós-natal.

Com base nos dados anteriores resultantes de pesquisas realizadas em nosso laboratório, onde observamos que a desnutrição materna na lactação programa alterações de peso corporal e função tireóidea na vida adulta, foram desenvolvidos alguns modelos experimentais com o objetivo de isolar os possíveis fatores candidatos responsáveis por tal programação. Foram estudados na lactação os seguintes modelos:

administração de tiroxina na prole (quadro 3), leptina na prole (quadro 4) e materna (quadro 5) e inibição da prolactina materna (quadro 6).

Quadro 3. Dados da programação (60 dias de idade) pelo hipertireoidismo neonatal

Peso corporal	↓	Moura <i>et al.</i> , 2008
Gordura total	↑	
Leptinemia	↑	
T ₃ e T ₄ totais	↓	
TSH sérico	↓	
Captação de ¹²⁵ I	↓	
Atividade D2 hipotalâmica	↑	
Atividade D2 hipofisária	↑	
Atividades D2 TAM	↓	
Atividade D1 muscular	↓	
Atividade GPDm hepática	↓	

Quadro 4. Dados da programação pela administração de leptina na prole

Peso corporal	↑	Cravo <i>et al.</i> , 2002; Toste <i>et al.</i> , 2006a
Gordura visceral e total	=	Toste <i>et al.</i> , 2006b
Catecolaminas	↑	Trevenzoli <i>et al.</i> , 2007
Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca	↑	
Glicemia	=	Toste <i>et al.</i> , 2006b
Insulinemia	↑	
Leptinemia	↑	Teixeira <i>et al.</i> , 2003; Toste <i>et al.</i> , 2006a
Efeito anorexigênico da leptina	↓	Toste <i>et al.</i> , 2006b
Ob-Rb hipotalâmico	↓	Toste <i>et al.</i> , 2006b; Dutra <i>et al.</i> , 2007
Ob-Rb tireóideo	↓	Dutra <i>et al.</i> , 2007
T ₃ e T ₄ livres	↑	Teixeira <i>et al.</i> , 2003; Toste <i>et al.</i> , 2006a
TSH sérico	↓	Toste <i>et al.</i> , 2006a
Atividade D1 hepática	↓	Dutra <i>et al.</i> , 2007
Atividade GPDm hepática	↓	Toste <i>et al.</i> , 2006a; Dutra <i>et al.</i> , 2007

Quadro 5. Dados da programação pela administração materna de leptina

Peso corporal	↑	Lins <i>et al.</i> , 2005
Gordura retroperitoneal	↑	
Leptinemia	↑	
Efeito anorexigênico da leptina	↓	
T ₃ total	↑	Passos <i>et al.</i> , 2007
T ₄ total	=	
TSH sérico	=	
Captação de ¹²⁵ I	=	

Já a desnutrição neonatal provocada pela inibição da produção de leite (Bonomo *et al.*, 2005), via administração de um inibidor de PRL, a bromoergocriptina (BRO), agonista do receptor dopaminérgico do tipo 2, à ratas lactantes, programou um acúmulo de tecido adiposo retroperitoneal, caracterizando um sobrepeso, menor concentração sérica de TSH, T₃ e T₄, além de maior leptinemia e corticosteronemia na prole adulta (Bonomo *et al.*, 2007; Bonomo *et al.*, 2008).

Quadro 6. Dados da programação pela inibição da produção de leite

Peso corporal	↑	Bonomo <i>et al.</i> , 2007
Tecido adiposo retroperitoneal	↑	
Leptinemia	↑	
Efeito anorexigênico da leptina	↓	
Corticosteronemia	↑	Bonomo, 2003; Bonomo <i>et al.</i> , 2008
T ₃ e T ₄	↓	
TSH sérico	↓	

2 – Síndrome Metabólica

A Síndrome Metabólica é definida como um conjunto de fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e resistência à insulina (com ou sem intolerância à glicose), compreendendo dislipidemia com perfil aterogênico (redução de HDLc e hipertrigliceridemia), hiperinsulinemia, hipertensão arterial e obesidade (Reaven, 1988; Vanhala, 1999; Garaulet *et al.*, 2000).

A prevalência de componentes individuais da síndrome metabólica varia entre as populações, logo a prevalência da síndrome também varia. Diferenças na genética, dieta, níveis de superalimentação ou subnutrição, atividade física, idade e hábitos corporais influenciam a prevalência do distúrbio (Cameron *et al.*, 2004). Existe uma relação entre alguns parâmetros da síndrome metabólica e polimorfismos para os genes da leptina e de seus receptores (Duarte *et al.*, 2007). Assim, a leptinemia, ou a sua ação, pode contribuir para o surgimento da síndrome metabólica.

2.1 – Obesidade

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal em relação à massa corporal total, com conseqüente aumento de peso do indivíduo (Khan & Flier, 2000), podendo o armazenamento ser subcutâneo ou visceral.

A obesidade no adulto está associada a co-morbidades, como diabetes tipo 2, aumento da pressão arterial e desenvolvimento de doença cardíaca isquêmica (James, 1996). O aumento de gordura corporal, em particular visceral ou abdominal, é um fator de risco para a resistência à insulina e para desordens metabólicas (Godfrey & Barker, 2000; Gabriely *et al.*, 2002), sendo este tipo de obesidade mais relacionada à síndrome metabólica (McMillen *et al.*, 2006).

O tecido adiposo secreta uma série de proteínas circulantes capazes de afetar o metabolismo glicídico e lipídico (Havel, 2002), incluindo adiponectina, angiotensina II, leptina, resistina, vifastina, TNF α (Flier, 1995). Destas, a adiponectina parece ser a que apresenta relação mais forte com a resistência à insulina, encontrando-se diminuída em condições de aumento de adiposidade visceral.

Strbák *et al.* (1991) mostraram que o desmame precoce (até três meses de idade) estava associado à obesidade infantil (um a sete anos de idade). Porém, se o desmame ocorreu entre um e três meses de idade, os indicadores de aterogenicidade eram melhores, em decorrência de maior concentração sérica de lipoproteína de alta densidade (HDLc). O modelo experimental de bloqueio da secreção de prolactina em ratos parece se adequar aos dados epidemiológicos, haja vista que o bloqueio ao final

da lactação está associado a maior ganho de peso e adiposidade (Bonomo et al, 2007), enquanto no meio da lactação, leva a um quadro de menor peso corporal e gordura total na prole adulta (Pires, 2007).

Para testar a influência de altos níveis de colesterol materno sobre a programação do perfil lipídico da prole, foi feita experiência de adoção cruzada, de filhotes de mães knock out para apoE e controles. Os filhotes criados pelas mães knock out para apoE apresentavam mais hipercolesterolemia e maior incidência de aterosclerose, mesmo quando eram filhos biológicos de mães controle, sugerindo que a influência da colesterolemia materna é maior do que a predisposição genética (Goharkhay et al, 2007).

2.1.1 – Leptina

Indivíduos obesos apresentam hiperleptinemia (Zhang et al., 1994; Maffei et al., 1995), o que pode significar resistência hipotalâmica à ação anorexigênica deste hormônio, devido ao prejuízo no seu transporte pela barreira hemato-encefálica ou anormalidades nos receptores e/ou na sinalização pós-receptor (Jéquier, 2002). Hiperleptinemia associada a hiperfagia e obesidade indicam resistência à leptina e pode estar relacionada à gênese da obesidade (Maffei et al., 1995; Considine et al., 1996; Ahima et al., 2000; Ahima & Osei, 2004).

A leptina é um hormônio secretado principalmente pelo adipócito (Melmed & Kleinberg, 2002), porém a sua síntese já foi detectada em tecidos, como hipófise (Jin et al., 1999; Jin et al., 2000), cérebro (Morash et al., 1999), músculo esquelético (Wang et al., 1998), placenta (Señarís et al., 1997), estômago (Bado et al., 1998) e glândula mamária (Smith-Kirwin et al., 1998). Por meio de sinais hipotalâmicos específicos, regula a ingestão alimentar e o gasto energético, especialmente por meio do estímulo do sistema nervoso simpático (Zhang et al., 1994). Atua nos núcleos hipotalâmicos, pela inibição da produção do neuropeptídeo Y (NPY) e do hormônio concentrador de melanina (MCH), que estimulam a ingestão. Os efeitos da leptina estão relacionados também ao estímulo da síntese do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que inibe a ingestão e

eleva o gasto energético; assim como ao aumento da expressão do hormônio melanócito estimulante (α -MSH), via ativação da pró-ópiomelanocortina (POMC), promovendo também inibição da ingestão (Jéquier, 2002).

O receptor de leptina (Ob-R) pertence à família dos receptores de citocinas, e apresenta seis isoformas diferentes: *a*, *b*, *c*, *d*, *e* e *f* (Tartaglia *et al.*, 1995; Tartaglia, 1997). A leptina age principalmente pela sua ligação ao receptor de forma longa (Ob-Rb), ativando a via JAK2/STAT3 (janus quinase 2/ transdutor do sinal e ativadores da transcrição 3) (Ghilardi *et al.*, 1996; Vaisse *et al.*, 1996; Bjorbaek *et al.*, 1997; Tartaglia, 1997). O Ob-Rb é amplamente expresso no núcleo arqueado, hipotálamo ventromedial e dorsomedial, regiões cerebrais ligadas ao balanço energético (Elmqvist *et al.*, 1998); sendo também encontrado em adipócito e hipófise (Jin *et al.*, 1999), tireóide (Nowak *et al.*, 2002), ilhota pancreática, adrenal, endotélio vascular, ovário e fígado (Hoggard *et al.*, 1997; Ahima *et al.*, 1999).

2.1.2 – Adiponectina

A adiponectina é um hormônio protéico produzido pelos adipócitos, que possui propriedades anti-aterogênicas e de sensibilização à insulina (Hotta *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2002; Combs *et al.*, 2003).

Diferentemente da leptina, cuja concentração geralmente é proporcional à massa adiposa, a concentração de adiponectina é maior em mulheres e indivíduos magros, estando inversamente relacionada com a quantidade de gordura corporal (Arita *et al.*, 1999).

A administração intracerebroventricular de adiponectina em ratos aumenta o gasto energético, sugerindo que a adiponectina atua no SNC, regulando o metabolismo energético, pelo incremento da termogênese e da oxidação lipídica (Qi *et al.*, 2004).

2.2 – Dislipidemia

Dislipidemia é qualquer alteração na concentração de um ou mais lipídios circulantes, caracterizada principalmente por concentração maior de triglicerídeos (TG) e/ou lipoproteína de baixa densidade (LDLc), e menor concentração de lipoproteína de alta densidade (HDLc). (HENRY, 1995).

Modificações nas lipoproteínas plasmáticas são evidentes em obesos, notadamente quando há aumento de gordura visceral, sendo as mais freqüentes: hipertrigliceridemia, maior VLDLc (lipoproteína de muito baixa densidade) e menor HDLc (Després, 1991). Um quadro de hiperlipidemia, com aumento na quantidade de lipoproteínas transportadoras de colesterol e triglicerídeos, é considerado a causa de arteriosclerose, com possível ocorrência de trombose ou infarto (Arafa, 2005).

O colesterol está presente nos tecidos e nas lipoproteínas plasmáticas, sob a forma livre ou combinada com ácidos graxos de cadeia longa, quando formam os ésteres de colesterol. As lipoproteínas são as responsáveis pelo transporte do colesterol pela circulação, para utilização e armazenamento, sendo a LDLc a responsável pelo seu transporte aos tecidos extra-hepáticos, além de mediar a sua captação e de seus ésteres em muitos tecidos. A LDLc é conhecida como um importante fator da gênese da aterosclerose, por favorecer a deposição de colesterol na parede dos vasos. A LDLc sérica regula a síntese de colesterol mediante o fenômeno de *down-regulation* dos receptores para LDLc (Goldstein & Brown, 1992; Brown & Goldstein, 1986).

As concentrações de HDLc estão inversamente relacionadas à formação das placas de ateroma, provavelmente pelo fato de seus níveis séricos refletirem a eficiência de remoção de colesterol dos tecidos. O colesterol livre é removido dos tecidos pela HDLc e transportado para o fígado para conversão a ácidos biliares, no processo conhecido como transporte reverso de colesterol (Lehninger *et al.*, 1993). A diminuição de HDLc está relacionada a maior risco de doenças cardiovasculares, mesmo em pacientes com LDLc controlado pelo uso de estatina (risco cardiovascular residual).

O tratamento com ácido nicotínico tem mostrado tanto aumentar a HDLc sérica quanto reduzir o risco cardiovascular residual (Hausenloy & Yellon D, 2008).

Em seres humanos, Byberg *et al.* (2000) apesar de encontrarem relação entre baixo peso ao nascer e síndrome metabólica, não encontraram relação com a dislipidemia. O risco de doenças cardiovasculares em indivíduos com baixo peso ao nascer, chega a ser três vezes maior (Barker *et al.*, 1989). As concentrações séricas de apolipoproteína B, que estão relacionadas ao LDLc, estão aumentadas em indivíduos adultos que tiveram baixo peso na infância (Fall *et al.*, 1992).

Em animais experimentais, a ligadura da artéria uterina produz uma desnutrição fetal, que programa estes animais, na idade adulta, para intolerância glicídica, obesidade e dislipidemia, caracterizada por altas concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total, LDLc, e HDLc diminuída (Nüsken *et al.*, 2008).

A restrição calórica na gestação, programa na prole, aos três meses de idade, um aumento nos triglicerídeos e colesterol hepáticos, nos ratos machos, com aumento na ácido graxo sintetase e na lipoproteína lipase (Choi *et al.*, 2007), enquanto as fêmeas apresentam menor concentração de colesterol hepático. Tanto machos quanto fêmeas, apesar destas alterações hepáticas, não apresentam modificação nas concentrações séricas de lipídios. Assim, a programação parece afetar mais os machos que as fêmeas.

A restrição protéica na gestação, em ratos machos, programa para maior concentração sérica de triglicerídeos e colesterol. Porém, se a restrição ocorre na lactação, ocorre menor concentração sérica de lipídios totais na idade adulta (Zambrano *et al.*, 2006).

2.3 – Hiperinsulinemia e Resistência à Insulina

A hiperinsulinemia é apontada como o indicador mais importante da síndrome metabólica (Reaven, 2003). Embora a resistência à insulina cause hiperinsulinemia, a exposição aumentada à insulina pode também causar resistência, por *down-regulation* de seus receptores (Kasim-Karakas, 2000).

A co-existência de variáveis de risco para doenças cardiovasculares relacionadas à síndrome metabólica está bem documentada em estudos epidemiológicos com adultos e crianças. Embora os mecanismos patológicos desta síndrome não sejam completamente claros, os estudos prospectivos sugerem que a hiperinsulinemia ou a resistência à insulina exerçam um papel importante no seu desenvolvimento (Jeppesen *et al.*, 2000).

O catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos inicia-se com a sua hidrólise pela enzima lipoproteína lipase (LPL), exercendo a LPL um papel importante, como facilitadora da captação das lipoproteínas remanescentes para a célula (Merkel *et al.*, 1998). As lipoproteínas remanescentes (quilomicrons e VLDL c) que não são captadas podem penetrar no endotélio fenestrado e promover a formação de placas de ateroma (Cooper, 1997). A maioria das pessoas com níveis elevados de VLDL c possui maior taxa de secreção de lipoproteínas ricas em triglicerídeos plasmáticos (Ginsberg, 2000). A causa fisiológica mais comum para esta anormalidade parece ser a resistência à insulina, com a combinação de fluxo aumentado de ácidos graxos da periferia e lipogênese estimulada pela insulina, aumentando a produção de VLDL c (Ginsberg, 2002).

A resistência clássica à insulina promove aumento de tecido adiposo visceral, de ácidos graxos e triglicerídeos plasmáticos, com redução da concentração de HDL c. A maior adiposidade visceral eleva sua suscetibilidade à lipólise, levando ao aumento de ácidos graxos circulantes. Este excesso de ácidos graxos reduz a utilização de glicose no músculo e aumenta a saída de glicose hepática, tendendo a diminuir o glicogênio nestes dois tecidos. O excesso de TG na circulação portal inibe a extração e o *clearance* de insulina pelo fígado, e causa a hiperinsulinemia (Després & Marette, 1994; Kasim-Karacas, 2000; Jang *et al* 2001).

A obesidade é o estado clínico mais comum caracterizado pela resistência à insulina (Vanhala, 1999). O acúmulo de gordura visceral induz resistência à insulina, que estimula as células β -pancreáticas a secretar mais insulina para manter o metabolismo normal da glicose. A hiperinsulinemia resultante exacerba a resistência à insulina e

aumenta o acúmulo de gordura (Després & Marette, 1994). Este acúmulo de gordura pode resultar em uma deficiência relativa da secreção de insulina (Reaven, 1992).

Obesos resistentes à insulina e diabéticos possuem reservas maiores de triglicerídeo hepático que contribuem primariamente para a síntese de VLDLc (Zammit, 1996).

O aumento de proteínas secretadas pelo tecido adiposo, tais como TNF- α (Hotamisligil, 1999), angiotensinogênio (Karlsson *et al.*, 1998) e resistina (Steppan *et al.*, 2001), está associado com a resistência insulínica.

Leptina e insulina são os maiores sinalizadores para o hipotálamo manter a homeostase energética e a adiposidade corporal (Obici *et al.*, 2002), agindo por meio da inibição de peptídeos orexigênicos e estímulo dos anorexigênicos. Receptores de insulina (IR) e de leptina (ObRb) compartilham uma série de elementos na cascata de sinalização, tais como JAK2/STAT-3 e PI3K (fosfoinositol 3-cinase). Sugere-se que leptina e insulina possuam efeitos de sobreposição no controle da ingestão alimentar. Já foi demonstrado que o tratamento crônico com leptina e insulina promove uma *down regulation* do IR e ObRb, respectivamente (Benomar *et al.*, 2005). A sobreposição de efeitos da insulina e leptina tem sido atribuída à ação negativa destes hormônios sobre a fosforilação de JAK e STAT3 (Carvalho *et al.*, 2001), pelo aumento da SOCS3, e esta é também capaz de inibir a via de sinalização da insulina, em PI3K (Bjorbak *et al.*, 2000; Banks *et al.*, 2000).

3 – Programação por redução de ninhada

Existe uma relação inversa entre tamanho da ninhada e peso corporal. Ratos criados em ninhadas reduzidas (3-4 filhotes/lactante) são utilizados para o estudo dos efeitos imediatos e em longo prazo da superalimentação pós-natal. Tais estudos demonstram que estes animais apresentam aumento no ganho de peso na lactação, que persiste na vida adulta. Animais criados em ninhadas reduzidas apresentam maior gordura visceral, hiperfagia, hiperleptinemia, hipertensão, hiperinsulinemia e hiperglicemia (Plagemann *et al.*, 1992; Plagemann *et al.*, 1999, Velkoska *et al.*, 2005).

Em um modelo de supernutrição por redução da ninhada, Rodrigues *et al.* (2007) encontraram menor captação de glicose no tecido adiposo, associado a menor expressão de GLUT-4, IRS-1, PI3K e atividade AKT, neste tecido.

Lemonier *et al.* (1973) mostraram que a supernutrição por redução da ninhada causa hiperinsulinemia na prole adulta de camundongos. Em ratos, a redução da ninhada produz, além da hiperinsulinemia, aumento de colesterol na idade adulta (Hahn, 1984). Duff e Snell (1980) mostraram que animais criados em ninhadas pequenas, apresentavam uma superexpressão de enzimas hepáticas envolvidas na síntese de lípidos, quando adultos, tais como a enzima málica, a glicose -6-fosfato desidrogenase, ácido graxo sintetase e ATP-citrato ligase.

Portanto, há evidências de que a superalimentação pós-natal é um importante fator de risco para obesidade, dislipidemia e outras co-morbidades associadas.

4 – Programação pela exposição à nicotina

As consequências para a saúde decorrente do hábito de fumar já são bastante conhecidas, e têm sido umas das principais causas para o aumento da morbimortalidade, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (Report of the Royal College of Physicians, 2002). Indivíduos que fumam apresentam uma série de efeitos colaterais que aumentam o seu risco para doença cardiovascular, incluindo resistência à insulina, aumento de catecolaminas séricas, que elevam a frequência cardíaca e a pressão arterial, e hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e diminuição de HDL c (Campbell *et al.*, 2008).

Na gestação, o tabagismo é considerado um fator de risco de mortalidade perinatal, baixo peso ao nascer e anormalidades neurológicas (Butler & Goldstein, 1973; Navarro *et al.*, 1989; DiFranza & Lew, 1995). Estudos epidemiológicos evidenciaram que crianças nascidas de mães fumantes apresentam maior risco de desenvolvimento de obesidade e hipertensão na vida adulta (Morley *et al.*, 1995; Vik *et al.*, 1996; Blake *et al.*, 2000; Toschke *et al.*, 2002; Von Kries *et al.*, 2002; Wideroe *et al.*, 2003; Bergmann *et al.*, 2003), embora os mecanismos associados a estes efeitos ainda não estejam claros.

Em ratos, a exposição à nicotina por toda a gestação e nos dez primeiros dias de vida causa um aumento de peso corporal da prole, a partir dos 35 dias de vida (Chen & Kelly, 2005). Nos ratos machos esse aumento é transitório, entretanto nas fêmeas, o aumento de peso corporal persiste até a idade adulta. Outro estudo relatou que o peso corporal de ratos cujas mães receberam nicotina na gestação e lactação tornou-se maior aos 70 dias de vida. Aos seis meses de vida, o peso corporal e os pesos de ventrículo esquerdo, gordura epididimal, mesentérica e peri-renal foram significativamente maiores nas proles expostas precocemente à nicotina (Gao *et al*, 2005).

Em nosso laboratório, recentemente, evidenciamos que a administração de nicotina em ratas lactantes programou suas proles adultas para maior peso e adiposidade corporais, sugerindo uma predisposição à obesidade na vida adulta, além de hipotireoidismo (Oliveira, 2008).

5 – Programação por desnutrição neonatal em ovelhas

A maioria dos estudos experimentais de programação é realizado em roedores. Em comparação com os seres humanos, os ratos têm ninhadas com dez a doze animais, o que na espécie humana é praticamente impossível. Assim, avaliar modelos de programação em animais que tenham uma prole semelhante a dos seres humanos, torna-se essencial para validar determinadas conclusões. Desta forma, com a finalidade de verificar a programação do peso corporal e da dislipidemia, colaboramos no estudo da desnutrição neonatal em ovelhas.

Em trabalho desenvolvido em nosso laboratório (Souza JR, 2008; dados não publicados), foi estudada a programação do peso corporal e da função tireoideia em ovinos (*Ovis aries*), a partir do modelo de restrição calórica (RC) e protéica (RP) materna na lactação, simulando a restrição alimentar na estação de seca, período que coincide com maior ocorrência de partos.

Os cordeiros RC e RP tiveram, respectivamente, 25 % e 40% menor ganho de peso ao fim da lactação. Após o desmame, o peso corporal se manteve menor, sendo que, aos 12 meses de idade, foi 16% menor no RP e 13% no RC.

Quanto à função tireóidea na lactação, os HTs séricos foram menores nos cordeiros RP e RC. Já os borregos RC de 12 meses, embora sem exibir alteração de HTs, tiveram maior atividade da D1 hepática e menor atividade D2 hipofisária, além de menor D1 e D2 tireoideana. Ambos os borregos adultos programados pela desnutrição pós-natal apresentaram maior a atividade α -GPDm no fígado.

Não existem relatos na literatura sobre a programação do perfil lipídico pela desnutrição neonatal, em ovelhas.

OBJETIVOS

Avaliar as alterações do perfil lipídico em diferentes modelos experimentais de programação em roedores e/ou ovinos, a saber:

Roedores:

- desnutrição protéica materna na lactação
- bloqueio da prolactina ao final da lactação
- administração de leptina nos dez primeiros dias de vida
- supernutrição por redução do tamanho da ninhada
- exposição materna à nicotina na lactação

Ovinos:

- desnutrição protéica e calórica em ovelhas lactantes

Relacionar o perfil lipídico dos animais com adiposidade e homeostase glicêmica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Ratas Wistar, nulíparas, adultas (três meses de idade), foram mantidas em biotério com temperatura ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro, 12:00H (7:00h – 19:00H) controlados. Os animais foram acasalados na proporção de duas fêmeas para um macho, recebendo ração comercial (23% de proteína) e água *ad libitum*. Após 24 horas do nascimento, cada ninhada foi ajustada para seis filhotes machos, com o objetivo de maximizar o potencial lactotrófico (Passos et al, 2000). Durante a lactação, as nutrizes e as ninhadas foram aleatoriamente distribuídas nos grupos experimentais abaixo. Dois filhotes de cada ninhada foram utilizados na idade adulta para as avaliações, a fim de evitar o efeito ninhada.

Subprojeto 1 – Restrição protéica materna na lactação

Ao nascimento, distribuímos as ratas lactantes em dois grupos:

- **RP (restrição protéica):** livre acesso à água e à dieta hipoprotéica (8% de ptn), no total de 6 animais.
- **C (controle):** livre acesso à água e à dieta normal (23% de ptn) , no total de 6 animais.

A dieta hipoprotéica foi elaborada em nosso laboratório e sua composição é mostrada na tabela 1. A fonte protéica (soja) foi a ração comercial macerada (Labina[®] – Purina Nutrimentos LTDA). A fim de se obter uma dieta hipoprotéica e isocalórica , acrescentamos amido de milho. Vitaminas e sais minerais foram compensados , de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition Rodents Diets AIN-93G*.

A RP foi iniciada ao nascimento (dia 0) e mantida até os 21 dias da lactação (desmame). Após o desmame, as proles receberam dieta normal até o dia d a morte.

As proles C e RP foram mortas aos 180 dias de idade, por decapitação. Utilizamos seis mães por grupo e dois filhotes adultos por mãe.

Este modelo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Para Uso Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA/183/2007).

Tabela 1: Composição das rações normo e hipoprotéica para 1 kg de ração

Ingredientes (g)	Controle	Hipoprotéica
Proteína de soja	230.0	80.0
Amido de milho	676.0	826.0
Óleo de soja	50.0	50.0
Mistura de vitaminas**	4.0	4.0
Mistura de minerais**	40.0	40.0
Análise:		
Energia Total (kcal)	4070.4	4070.4
Proteína (%)	23.0	8.0
Carboidrato (%)	66.0	81.0
Lipídios (%)	11.0	11.0

** Mistura de vitaminas e minerais formulada conforme recomendação do Instituto Americano de Nutrição AIN-93G de dieta para roedores; contém a quantidade recomendada de iodo (Reeves *et al*, 1993).

Subprojeto 2 – Bloqueio da prolactina nos três últimos dias de lactação

Ao nascimento, distribuímos as ratas lactantes em dois grupos:

- **BRO (bromocriptina)**: recebeu 1 mg de 2-bromo-alfa-ergocriptina (Novartis, SP, BR) em 200 µl (solução metanol-salina, 1:1), duas vezes ao dia, i.p., nos três últimos dias da lactação;

- **C (controle)**: recebeu 200 µl de solução metanol-salina 1:1, 2x/dia, i.p., nos três últimos dias da lactação.

As proles BRO e C foram mantidas até a idade adulta (180 dias); para cada determinação, utilizamos dois filhotes machos provenientes de cada rata lactante (total de seis ninhadas).

Este modelo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA/186/2007).

Subprojeto 3 – Supernutrição por redução do tamanho da ninhada

No 3º dia de lactação, distribuímos os recém-nascidos entre as mães da seguinte forma:

- **SUPERALIMENTADO (S):** tamanho da ninhada ajustado para três filhotes machos/lactante (ninhada reduzida), num total de 6 ninhadas.

- **CONTROLE (C):** permanece com 10 filhotes/lactante (ninhada completa), num total de 6 ninhadas.

A morte das proles S e C (2 animais por ninhada) ocorreu no 180º dias de idade.

Este modelo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Para Uso Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA/184/2007).

Subprojeto 4 – Administração de leptina nos dez primeiros dias de vida

No dia do nascimento, os filhotes foram distribuídos em dois grupos, com 6 mães, cada:

- **Leptina (Lep):** injetado com 50 µL de leptina (recombinant mouse Lep^{tin} – National Hormone and Pituitary Program, Harbor-UCLA, Medical Center, CA, USA) diluída em salina, na dose de 8µg/100g de massa corporal, s.c., nos dez primeiros dias da lactação;

- **Controle (C):** injetado com 50 µL de NaCl 0,9%, s.c., nos dez primeiros dias da lactação.

A morte das proles ocorreu por decapitação, aos 150 dias de idade (2 animais por ninhada).

Este modelo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Para Uso Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA/184/2007).

Subprojeto 5 – Exposição materna à nicotina na lactação

Após 24 h do nascimento, as mães e suas proles foram distribuídas em dois grupos de 6 mães cada:

- **NIC (bomba de nicotina):** minibombas osmóticas (Alzet, 2ML2, Califórnia, EUA) implantadas 48 h pós-parto (s.c.), liberando solução de nicotina free base (6mg/Kg/dia) por 14 dias consecutivos de lactação;
- **C (bomba controle):** minibombas implantadas 48 horas pós-parto (s.c.), liberando salina.

A morte das proles (2 animais por ninhada) ocorreu no 180º dias de idade.

Nosso modelo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA/189/2007).

Subprojeto 6 – Desnutrição protéica e calórica em ovelhas durante a lactação

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados no Setor de Ovinocultura da Fazenda Experimental da Universidade Federal de Mato Grosso (FAMEV-UFMT), localizado no município de Santo Antônio do Leverger, a 30 km de Cuiabá-MT.

Utilizamos 36 ovelhas (*Ovis ayres*) mestiças deslanadas, adultas, pesando em torno de 41 ± 2 kg de massa corporal que, ao nascimento dos cordeiros, foram distribuídas em três grupos:

- **Controle (C):** dieta formulada de acordo com o National Research Council: nutrients requirements of sheep de 1985 (NRC-1985), com 15% de proteína bruta;
- **Restrição Calórica (RC):** dieta com restrição de 50% do nível do grupo C;
- **Restrição Protéica (RP):** dieta com 5% de proteína bruta.

Todas as ovelhas *lactantes* e seus respectivos cordeiros foram confinados em baias de alvenaria de 60 m² de área, contendo um bebedouro automático e cochos dimensionados para o número de animais. A desnutrição materna se iniciou 24 h pós-parto e durou todo o período de lactação (60 dias).

Ao desmame, todos cordeiros receberam dieta “ad libitum”, fundamentada no NRC-1985, à base de silagem de milho, concentrado e água, bem como sal mineral à vontade até tornarem-se adultos (12 meses de idade). Utilizamos apenas os machos, face à variabilidade inerente ao ciclo estral das fêmeas, ficando oito machos/grupo.

Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal - CEPA da UFMT (proc. nº. 23.108.008.784/07-4/UFMT).

Avaliações realizadas

A massa corporal total e a ingestão alimentar foram avaliadas a cada quatro dias do desmame, até a morte dos animais.

A quantidade ingerida de ração é igual à diferença entre o peso da ração que restou na gaiola (Rf) e a quantidade total colocada quatro dias antes (Ri). Calculamos a ingestão diária de ração, de acordo com a fórmula:

$$\text{Ingestão de ração (g)} = (R_i - R_f)n/4$$

Onde “n” corresponde ao número de ratos na gaiola e “4” é o número de dias.

À morte dos animais, coletamos a massa de gordura visceral (MGV) para estimar a adiposidade central, por meio da pesagem da gordura das regiões mesentérica, epididimal e retroperitoneal.

Avaliação da Composição Corporal:

Após a morte, todas as vísceras foram retiradas e desprezadas, incluindo o trato gastrointestinal. As carcaças foram pesadas, amolecidas e m autoclave por 1 h e homogeneizadas em liquidificador com água destilada na proporção 1:1 (Leshner *et al.*, 1972).

Todas as determinações para avaliação dos constituintes corporais tiveram suas diluições corrigidas, sendo os resultados expressos em g / 100 g de carcaça.

1 – Massa de Gordura Visceral – MGv

Após a pesagem, foi devolvida à carcaça.

2 – Conteúdo corporal de gordura total

O homogenato foi hidrolisado em banho -maria a 70°C por 2 h em KOH 30% e etanol absoluto; após adição de ácido sulfúrico 6M, os ácidos graxos totais e o colesterol livre foram extraídos mediante três lavagens sucessivas com éter de petróleo. O material foi transferido para um recipiente previamente pesado, e levado à capela de exaustão até ficar bem seco (Stansbie *et al.*, 1976).

3 – Quantidade de gordura subcutânea

Estimada pela subtração da MGv do conteúdo de gordura total.

Obtenção do Soro:

As amostras de sangue foram centrifugadas 3.000 rpm (1.500 xg), por 20 minutos, para obtenção do soro, que foi congelado a -20°C para posterior análise.

Determinação das Proteínas Séricas:

A reação do Biureto (Gornall *et al.*, 1949) foi realizada para mensuração das proteínas séricas totais. As proteínas presentes na amostra reagem com os íons cobre (II) em meio alcalino, originando um complexo colorido que é quantificado por espectrofotometria em 545 nm. Os valores foram expressos em g/dL.

A albumina sérica foi determinada pelo método do verde de bromocresol (Doumas *et al.*, 1971). A albumina presente na amostra reage com o verde de bromocresol em meio ácido, originando um complexo colorido que é quantificado por espectrofotometria em 630 nm em analisador automatizado (modelo A15 – BioSystems®). Os valores foram expressos em g/dL.

A fração globulina foi quantificada pela diferença entre a proteína total e a albumina. Os valores foram expressos em g/dL.

Avaliação do Perfil Lipídico:

Os níveis séricos de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), das frações HDL - colesterol (HDLc), LDL-colesterol (LDLc) e VLDL -colesterol (VLDLc) foram avaliados por método enzimático colorimétrico Biosystems® (Simões *et al.*, 2007).

O colesterol total foi mensurado pelo método da oxidase/peroxidase. O colesterol livre como os esterificados presentes na amostra originam um complexo colorido que é quantificado por espectrofotometria em 500 nm em analisador automatizado (modelo A15 – BioSystems®). Os valores foram expressos em mg/dL.

O colesterol das proteínas de baixa densidade (LDL -c), das de muito baixa densidade (VLDLc), e os quilomícrons são hidrolisados pela colesterol oxidase mediante uma reação enzimática acelerada que não forma cor. O detergente presente no reagente B solubiliza o colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL c) da amostra, através do método do detergente direto. O colesterol do HDL é quantificado por espectrofotometria em 600 nm, em analisador automatizado (modelo A15 – BioSystems®). Os valores foram expressos em mg/dL.

Os triglicerídeos também foram quantificados no soro, através do método de glicerol fosfato oxidase / peroxidase. Os triglicerídeos presentes na amostra originam um complexo colorido que é quantificado por espectrofotometria em 500 nm, em analisador automatizado (modelo A15 – BioSystems®). Os valores foram expressos em mg/dL.

Os valores de LDLc e VLDLc foram obtidos usando a fórmula de Friedewald (1972):

$$1) \text{ LDLc (mg/dL) = colesterol total - (Triglicerídeos/5) - HDLc}$$

$$2) \text{ VLDLc (mg/dL) = Triglicerídeos/5}$$

Os índices de Castelli I e II foram obtidos através das seguintes fórmulas:

$$1) \text{ Índice de Castelli I = Colesterol total / HDLc}$$

$$2) \text{ Índice de Castelli II = LDLc / HDLc}$$

Determinação da Glicemia:

A glicemia foi analisada no sangue da veia caudal dos ratos em jejum, utilizando-se um glicosímetro (ACCU-CHEK[®] Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), com tiras reagentes de glicose-glicose oxidase e leitura no aparelho por reflectância.

Dosagem da Insulina sérica:

Determinada com a utilização de *kit* comercial para RIE (ICN Biomedicals[®], USA), com coeficiente de variação intraensaio de 4,2%. Os valores foram expressos em $\mu\text{UI/ml}$, e o limite de detecção do ensaio foi de 0,1 a 10 ng/ml.

Avaliação da Sensibilidade Insulínica:

Estimada pelo índice de resistência insulínica (IRI), como descrito anteriormente (Ahrén & Scheurink, 1998), calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{IRI} = \text{Insulina } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{Glicemia (mmol/L)}$$

Determinação da Adiponectina Sérica:

Determinada com a utilização de RIE por *kit* comercial (Linco Research, Inc[®]), com coeficiente de variação intraensaio de 7%. Os valores foram expressos em ng/ml e o limite de detecção do ensaio foi de 0,5 a 100 ng/ml.

Análise Estatística:

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para a comparação entre os grupos de roedores, utilizamos o teste t de *Student* não pareado, enquanto que para os grupos de ovelhas utilizamos análise de variância (ANOVA) univariada com pós-teste de Newman-Keuls. No acompanhamento do peso corporal e ingestão alimentar foi utilizada ANOVA bi-variada, com pós-teste de *Newman-Keuls*. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Subprojeto 1 – Restrição protéica materna na lactação

Massa corporal e Ingestão alimentar

A prole RP mostrou menor ganho de peso corporal ($p < 0.0001$), desde a lactação (-41% ao desmame) até os 180 dias de idade (-18%; fig 1A), apesar de não apresentar alteração no consumo alimentar após o desmame (fig 1B).

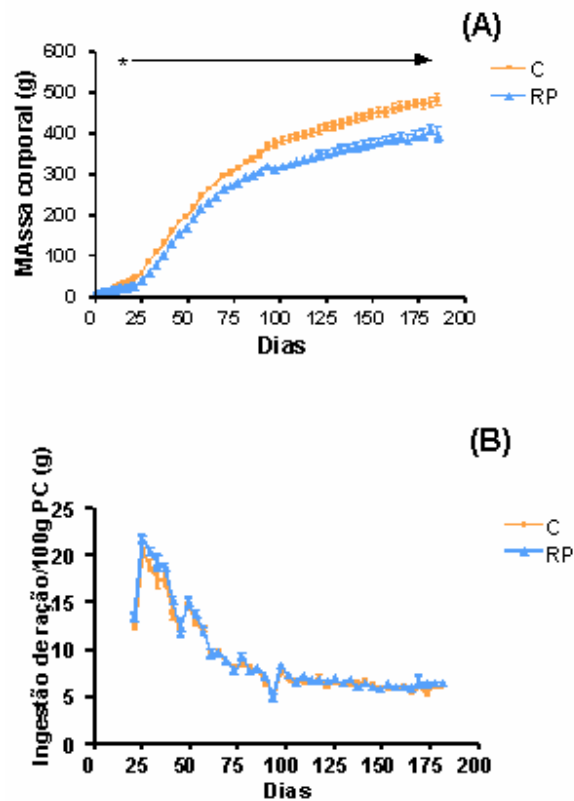


Figura 1: Evolução de massa corporal (A) e ingestão de ração (B) do desmame até os 180 dias de vida dos ratos controle (C) e restrição protéica (RP), $n = 12$ animais/grupo. Valores representam média $\pm$ EPM, * $p < 0.0001$.

Avaliação da Composição Corporal

A massa de gorgura visceral do grupo RP foi menor aos 180 dias de idade (-19%; $p < 0,05$, fig 2A), assim como o conteúdo de gordura total (-14%; $p < 0,05$, fig 2B).

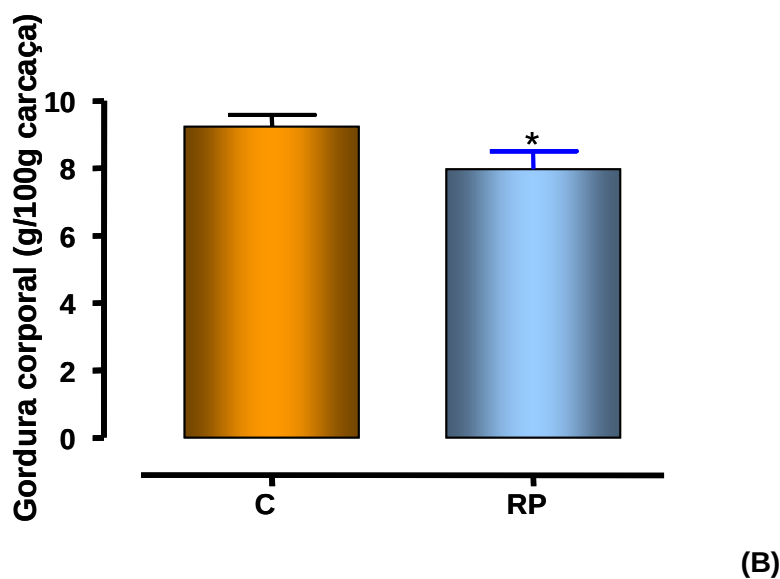
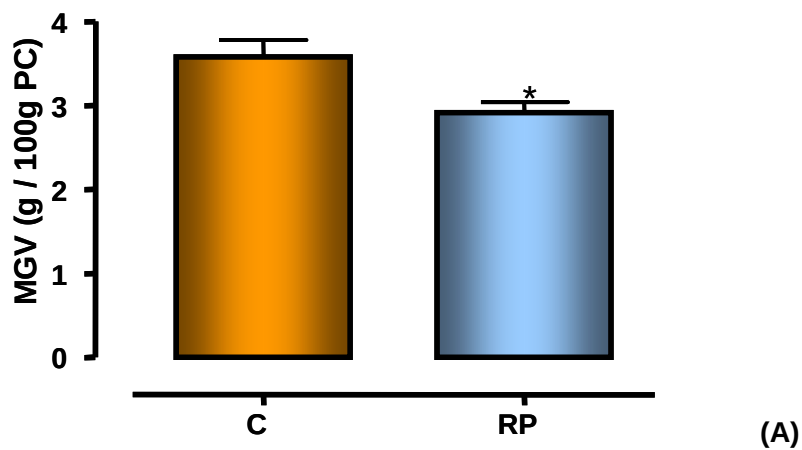


Figura 2. Massa de gordura visceral ou MGW (A) e gordura total (B) de ratos adultos cujas mães sofreram restrição protéica na lactação. Dados expressos como média $\pm$ EPM, onde: * $p < 0,05$. $n=12$ animais/grupo.

Homeostase Glicêmica

A tabela 2 mostra a avaliação do metabolismo glicídico da prole de mães submetidas à RP na lactação. A glicemia dos animais RP foi menor aos 180 dias de idade (-17%, $p < 0,05$), enquanto que insulinemia mostrou-se reduzida (-24%, $p < 0,05$; respectivamente). Apesar disto, em relação à sensibilidade à insulina, os animais RP não apresentaram alteração no IRI, nem na adiponectinemia (fig. 3).

Tabela 2: Metabolismo glicídico dos animais programados pela RP materna na lactação

180 dias		
Glicemia (mg/dL)	C	$80,9 \pm 3,7$
	RP	$67,00 \pm 2,0^*$
Insulinemia (μ UI/mL)	C	$67,4 \pm 5,8$
	RP	$51,4 \pm 4,3^*$
IRI	C	$268,1 \pm 33,7$
	RP	$238,6 \pm 33,0$

Valores representam média $\pm$ EPM; $n=12$ animais/grupo; * $p < 0,05$

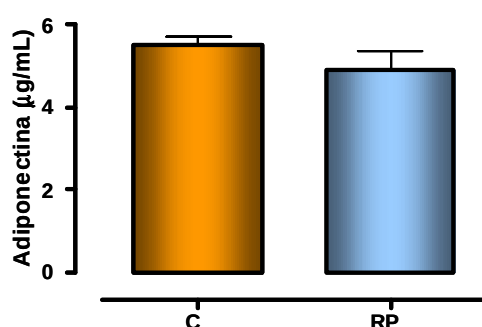


Figura 3 – Adiponectina sérica em animais programados pela RP materna durante a lactação. Valores representam média $\pm$ EPM; $n=12$ animais/grupo;

Determinação das proteínas séricas

A tabela 3 mostra que os animais RP não apresentam alterações nas concentrações séricas de proteínas e de suas frações.

Tabela 3: Proteínas séricas totais e frações dos animais programados pela RP na lactação

		180 dias
Proteínas totais (g/dL)	C	6,6 ± 0,3
	RP	6,3 ± 0,1
Albumina (g/dL)	C	2,9 ± 0,2
	RP	2,8 ± 0,1
Globulina (g/dL)	C	3,7 ± 0,1
	RP	3,5 ± 0,1

Valores representam média ± EPM; n=12 animais/grupo;

Avaliação do perfil lipídico

Como mostrado na tabela 4, os ratos RP apresentaram apenas menor colesterol total aos 180 dias (-16%, $p < 0.05$).

Tabela 4: Perfil lipídico dos animais programados pela RP materna na lactação

180 dias		
Colesterol total	C	68,0 ± 2,7
(mg/dL)	RP	57,8 ± 0,9*
HDLc	C	23,9 ± 1,4
(mg/dL)	RP	20,9 ± 1,4
LDLc	C	30,2 ± 3,7
(mg/dL)	RP	29,1 ± 1,3
VLDLc	C	8,9 ± 0,9
(mg/dL)	RP	10,8 ± 1,2
Triglicerídeos	C	45,4 ± 4,1
(mg/dL)	RP	44,9 ± 2,8
Índice de Castelli I	C	2,7 ± 0,1
	RP	2,9 ± 0,2
Índice de Castelli II	C	1,3 ± 0,2
	RP	1,4 ± 0,2

Valores representam média ± EPM; n=12 animais/grupo; * p<0,05

Subprojeto 2 - Bloqueio da prolactina nos 3 últimos dias de lactação

Massa corporal e Ingestão alimentar

A prole BRO aos 180 dias apresentou maior massa corporal total (+10%, $p=0,002$), sem alteração de ingestão alimentar relativa ao MCT (fig 4).

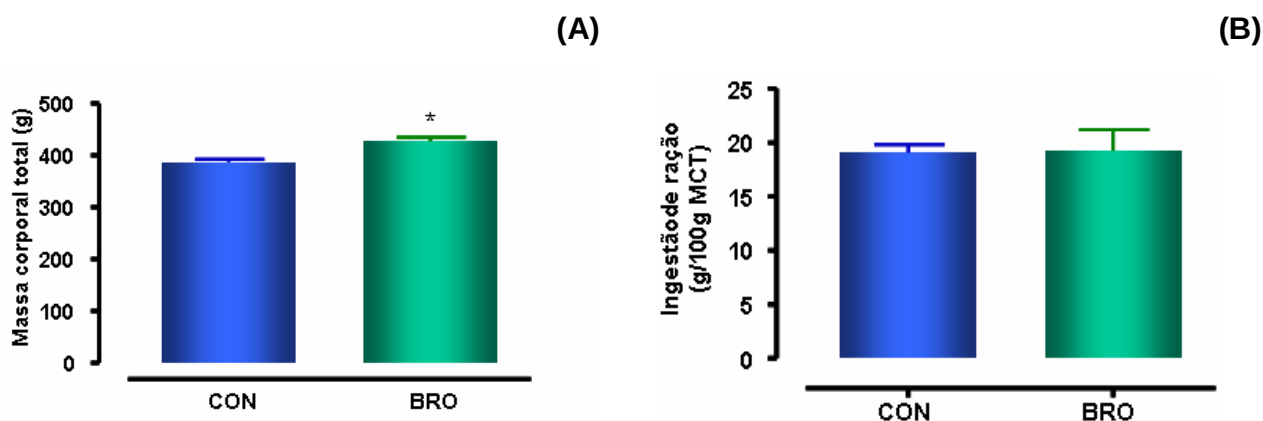


Figura 4. Massa corporal (A) e ingestão de ração (B) de ratos adultos cujas mães receberam BRO nos 3 últimos dias de lactação. Dados expressos como média $\pm$ EPM, onde: * $p < 0,002$, $n = 12$ animais/grupo.

Avaliação da Composição Corporal

Verificamos que a prole BRO apresentou maior massa de gordura visceral (20%, $p = 0,0001$; fig 5A), maior gordura corporal total (+41%, $p = 0,007$; fig 5B).

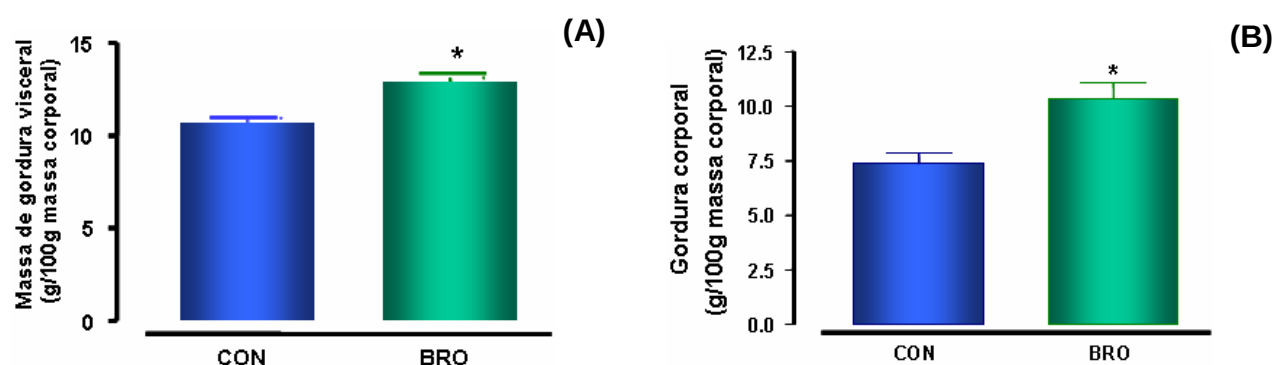


Figura 5. Gordura visceral (A) e total (B) de ratos adultos cujas mães receberam BRO nos 3 últimos dias de lactação. Dados expressos como média $\pm$ EPM, onde: * $p < 0,007$ ou menos, $n = 12$ animais/grupo.

Homeostase Glicêmica

Como mostrado na figura 6, a prole BRO apresentou maior glicemia (+16%, $p = 0,025$), sem qualquer alteração na insulina sérica, porém com maior índice de resistência à insulina (+24%, $p < 0,05$) e menor adiponectina sérica (-16%, $p = 0,02$).

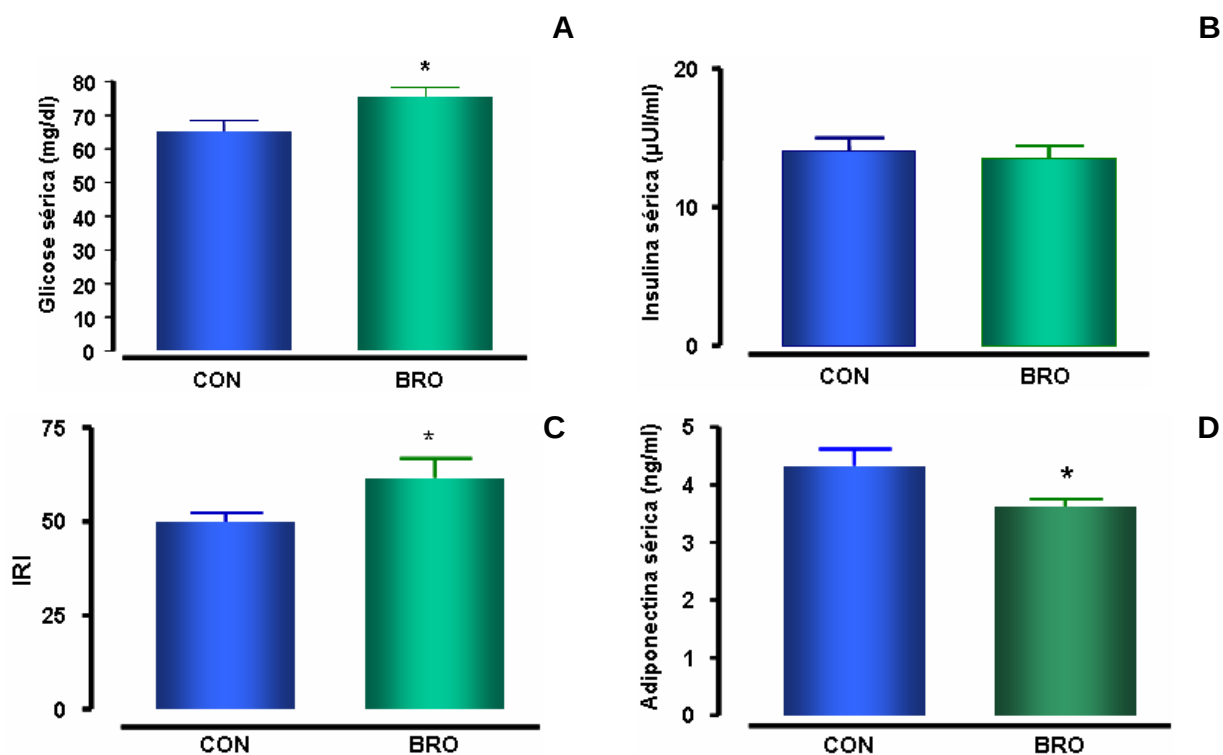


Figura 6. Glicemia (A), insulinemia (B), índice de resistência à Insulina – IRI (C) e adiponectinemia (D) de ratos adultos cujas mães receberam BRO nos 3 últimos dias de lactação. Dados expressos como média $\pm$ EPM, onde: * $p < 0,05$ ou menos. $n = 12$ animais/grupo.

Perfil lipídico

Encontramos maiores concentrações séricas de colesterol total (+30%, $p=0,003$; fig 7A), LDLc (+1,5X, $p=0,002$, fig 7B), VLDLc (+46%, $p<0,05$; fig 7D) e menor HDLc (-28%, $p=0,0009$; fig 7C).

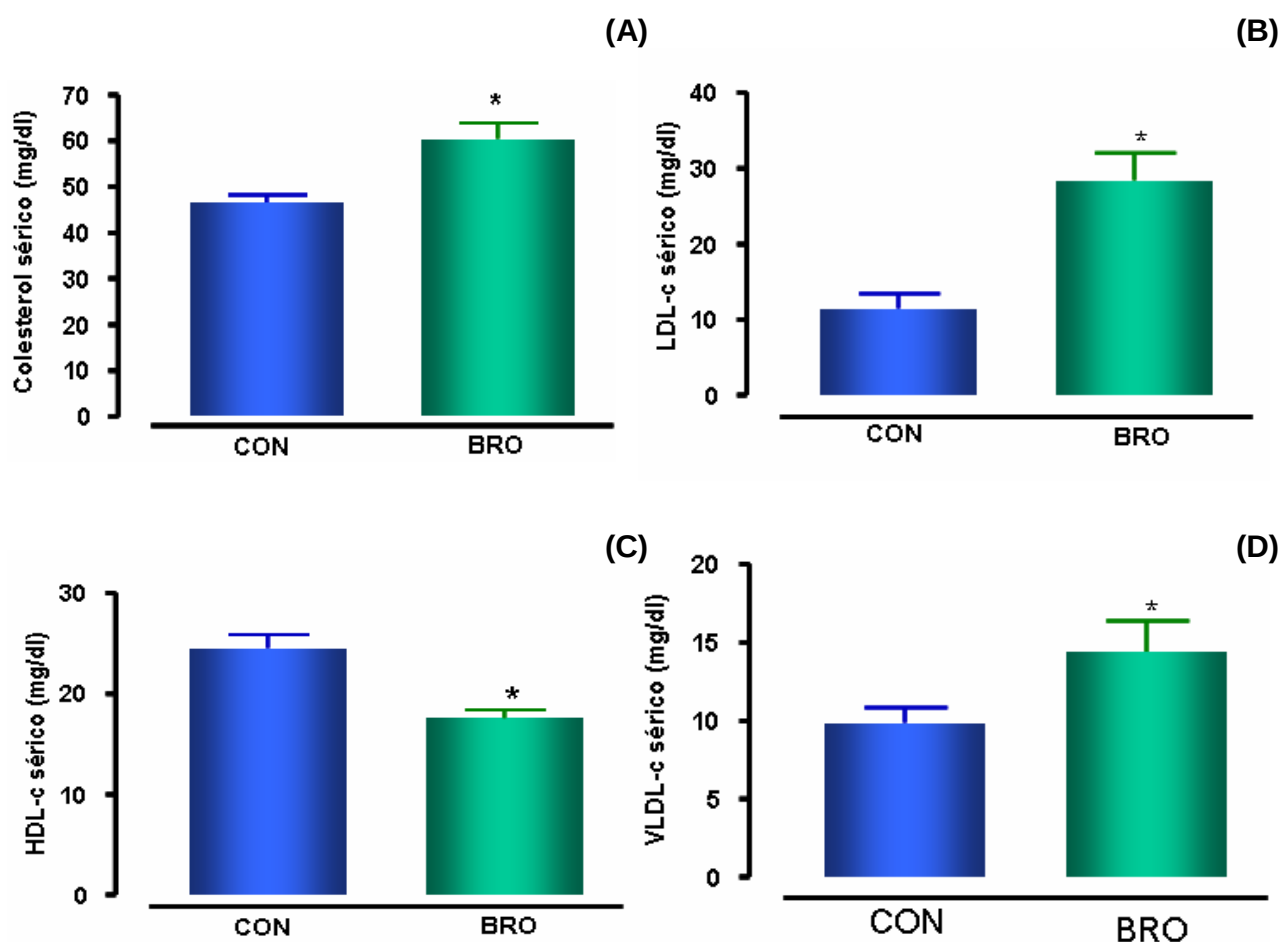


Figura 7. Concentrações séricas de colesterol (A), LDLc (B), HDLc (C) e VLDLc (D) de ratos adultos cujas mães receberam BRO nos 3 últimos dias de lactação: Dados expressos como média $\pm$ EPM, onde: * $p < 0,05$ ou menos. $n = 12$ animais/grupo.

Os níveis de triglicerídeos também foram maiores no grupo BRO (+49%, $p=0,04$; fig 8A). Na avaliação para risco de aterogênicidade (Índice de Castelli), verificamos maior índice do tipo I (+83%, $p=0,001$) e do tipo II (+2X, $p=0,005$) na prole BRO (figs 8B e 8C).

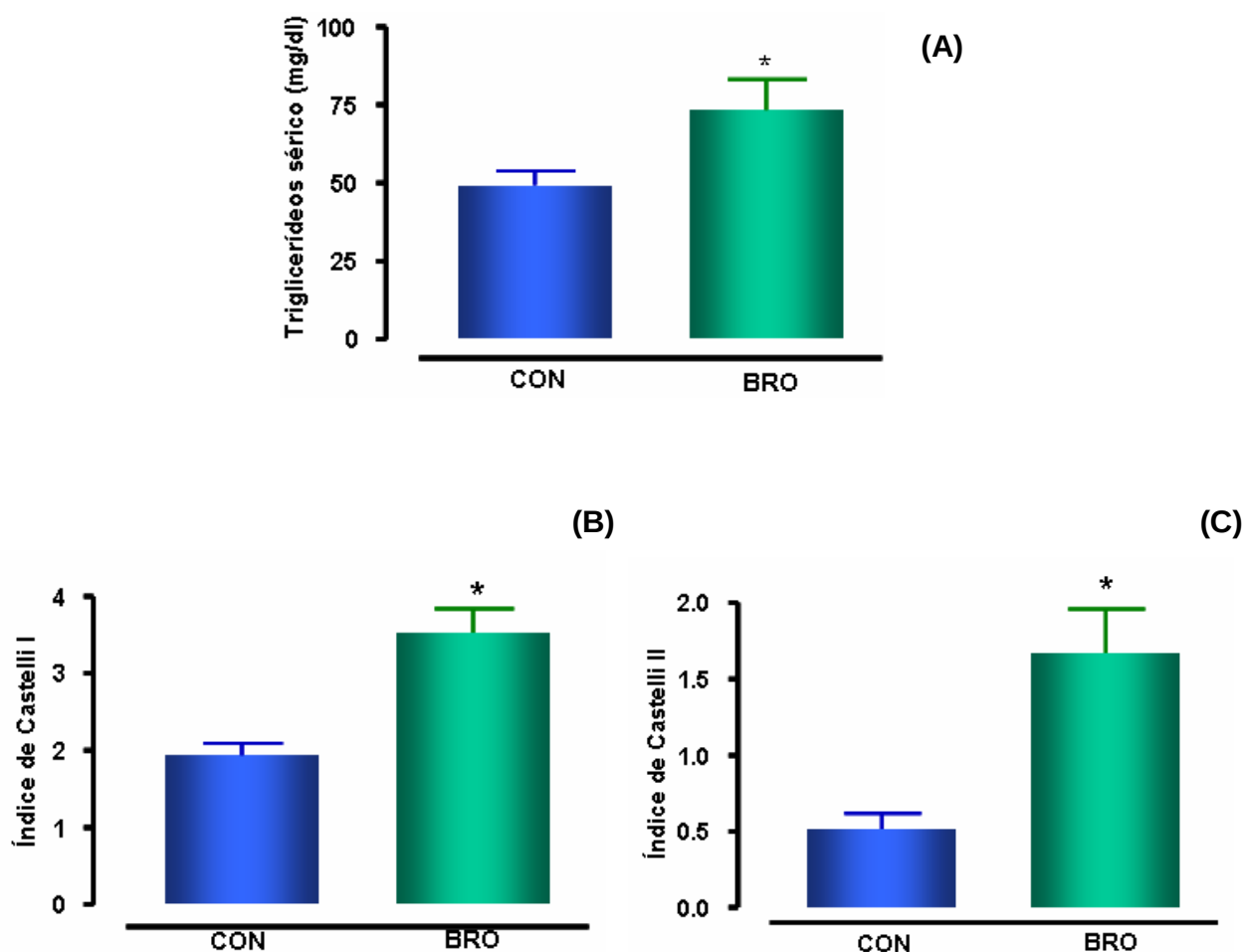


Figura 8. Concentração sérica de triglicerídeos (A), Índice de Castelli I (B) e Índice de Castelli II (C) de ratos adultos cujas mães receberam BRO nos 3 últimos dias de lactação: Dados expressos como média $\pm$ EPM, onde: * $p < 0,005$ ou menos. $n = 12$ animais/grupo.

Subprojeto 3 - Supernutrição por redução do tamanho da ninhada

Massa corporal e ingestão alimentar

A partir do 30º dia de vida, observou-se uma diferença de massa corporal de 45% ($p < 0,05$). Apesar da redução da diferença durante o desenvolvimento, os animais superalimentados atingiram a idade de 180 dias com 18% a mais de massa corporal, quando comparados ao grupo controle (Fig 9).

Acompanhando o consumo alimentar dos animais após o desmame, observamos que o grupo S exibiu uma ingestão de ração superior a dos animais controle. O maior consumo de ração pelos animais do grupo S foi observado aos 80 (+20%, $p < 0,05$) e aos 120 (+17%, $p < 0,05$) dias de vida e, semelhante ao observado com a massa corporal total, a diferença no consumo alimentar entre os grupos aos 180 dias (+9%, $p < 0,05$) de vida também foi significativo, porém menor que visto em idades mais jovens (Fig 10).

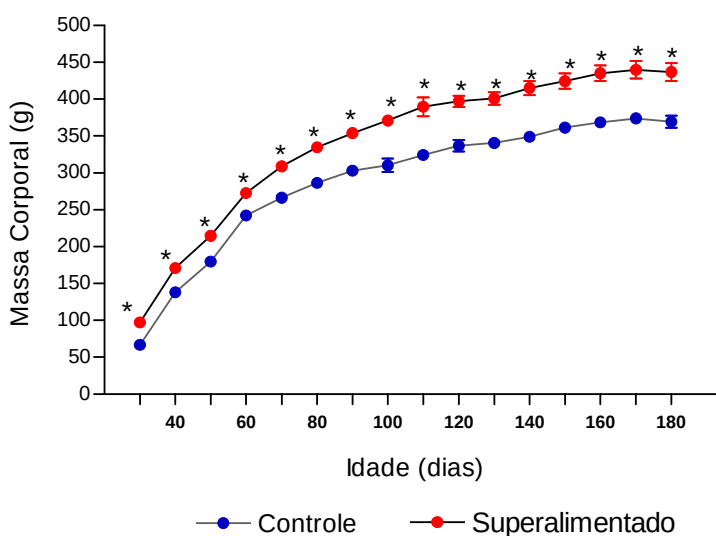


Figura 9 – Evolução da massa corporal entre 30 e 180 dias de vida. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão. $n=12$ para ambos os grupos. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

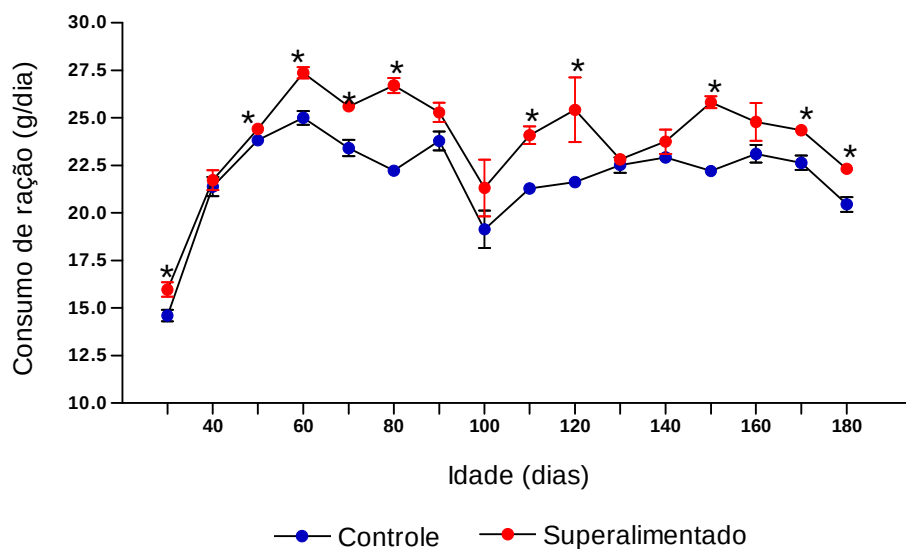


Figura 10 : Consumo de ração dos animais C e S durante o desenvolvimento. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão. n=12 para ambos os grupos. * $p<0,05$ quando comparados ao grupo controle.

Avaliação da Composição Corporal

Os animais do grupo S apresentaram maior massa de gordura visceral e total (visceral: +52% e total: +38%; $p<0,05$) (Fig 11). A gordura subcutânea estimada foi não mostrou diferença significativa entre os grupos (Fig 11).

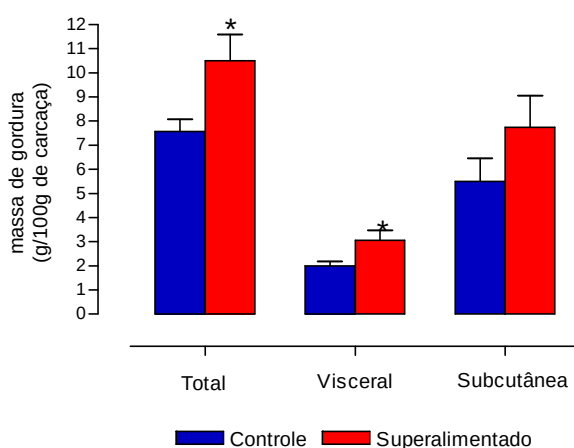


Figura 11: Gordura corporal total, visceral e subcutânea. As barras em azul representam o GC e em vermelho o GS. n=12 para ambos os grupos. * $p<0,05$ quando comparados ao grupo controle.

Homeostase Glicêmica

A tabela 5 mostra a avaliação do metabolismo glicídico da prole cuja ninhada foi reduzida. A glicemia e a insulinemia dos animais superalimentados não mostrou alteração aos 180 dias, assim, como a estimativa de resistência à insulina e a adiponectinemia (fig 12).

Tabela 5: Metabolismo glicídico dos ratos programados pela supernutrição na lactação

180 dias		
Glicemia (MG/dL)	C	82,9 ± 2,4
	S	82,4 ± 3,1
Insulinemia (μUI/mL)	C	45,1 ± 8,3
	S	44,2 ± 3,4
IRI	C	187,8 ± 23,8
	S	195,5 ± 11,5

Valores representam média ± EPM; n=12 animais/grupo; * p<0,05

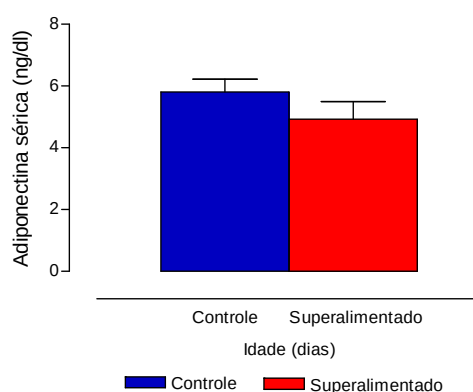


Figura 12 – Adiponectina sérica em animais programados pela redução da ninhada na lactação. Valores representam média ± EPM; n=12 animais/grupo;

Determinação das proteínas séricas

A tabela 6 mostra que os animais supernutridos na lactação apresentam concentração sérica de proteínas totais normais, porém a concentração de albumina foi 12% menor e a de globulina 8% maior.

Tabela 6: Proteínas séricas totais e frações dos animais programados pela supernutrição na lactação

180 dias		
Proteínas totais (g/dL)	C	7,74 ± 0,14
	S	7,5 ± 0,17
Albumina (g/dL)	C	3,88 ± 0,11
	S	3,4 ± 0,14 *
Globulina (g/dL)	C	3,86 ± 0,07
	S	4,16 ± 0,08 *

Valores representam média ± EPM; n=12 animais/grupo; * p<0,05

Avaliação do perfil lipídico

Como mostrado na tabela 7, os ratos S, aos 180 dias de idade, apresentaram como única alteração, uma menor concentração sérica de HDLc (-6%, $p < 0,05$).

Tabela 7: Perfil lipídico dos animais programados pela supernutrição na lactação.

180 dias		
Colesterol total	C	58,65 ± 1,0
(mg/dL)	S	57,50 ± 1,7
HDLc	C	16,52 ± 0,6
(mg/dL)	S	14,53 ± 0,7 *
LDLc	C	32,78 ± 1,3
(mg/dL)	S	31,94 ± 1,3
VLDLc	C	11,19 ± 0,7
(mg/dL)	S	10,60 ± 0,7
Triglicerídeos	C	55,48 ± 3,6
(mg/dL)	S	52,50 ± 3,2
Índice de Castelli I	C	3,8 ± 0,12
	S	3,99 ± 0,19
Índice de Castelli II	C	2,06 ± 0,11
	S	2,28 ± 0,17

Valores representam média ± EPM; n=12 animais/grupo; * $p < 0,05$

Subprojeto 4 – Administração de leptina nos dez primeiros dias de vida

Massa corporal e Ingestão alimentar

A prole tratada com leptina ganhou mais massa corporal, a partir dos 60 dias de vida, e ingeriu mais ração, a partir de 100 dias de vida, como mostra a figura 13.

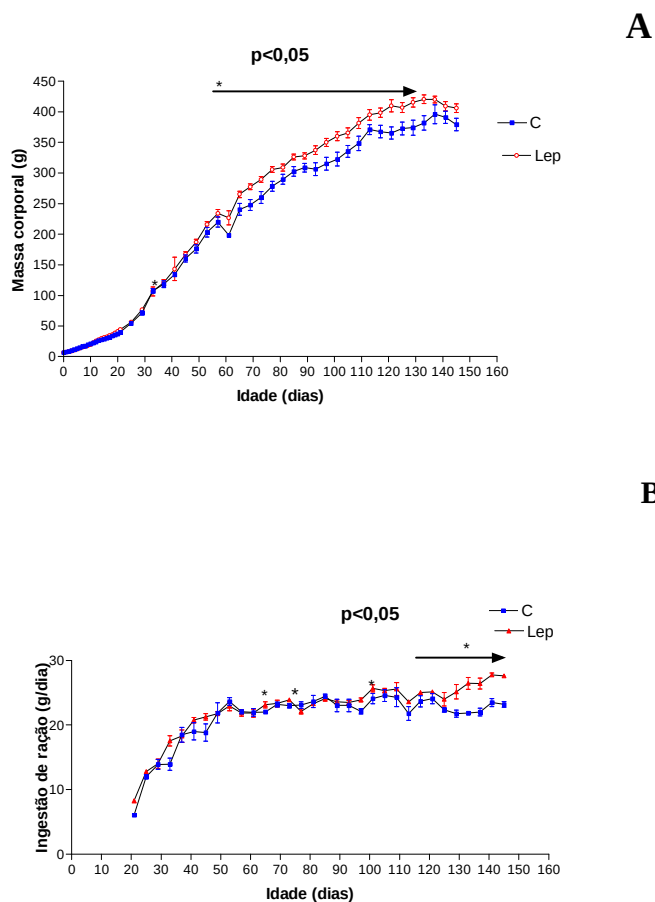


Figura 13 – Massa corporal (A) e ingestão de ração (B) na prole tratada com leptina nos 10 primeiros dias de lactação. Grupo Lep - livre acesso à água e ração, recebendo injeção de 8µg de leptina/100g PC; Grupo Controle livre acesso à água e ração, recebendo injeção de solução salina. Os dados estão expressos como média ± erro padrão de 12. A seta indica diferença significativa entre os grupos * p<0,05 vs C

Avaliação da Composição Corporal

A figura 14 mostra que a gordura corporal total não difere do controle aos 150 dias, porém a MGV foi menor (-23,8%, $p<0,05$).

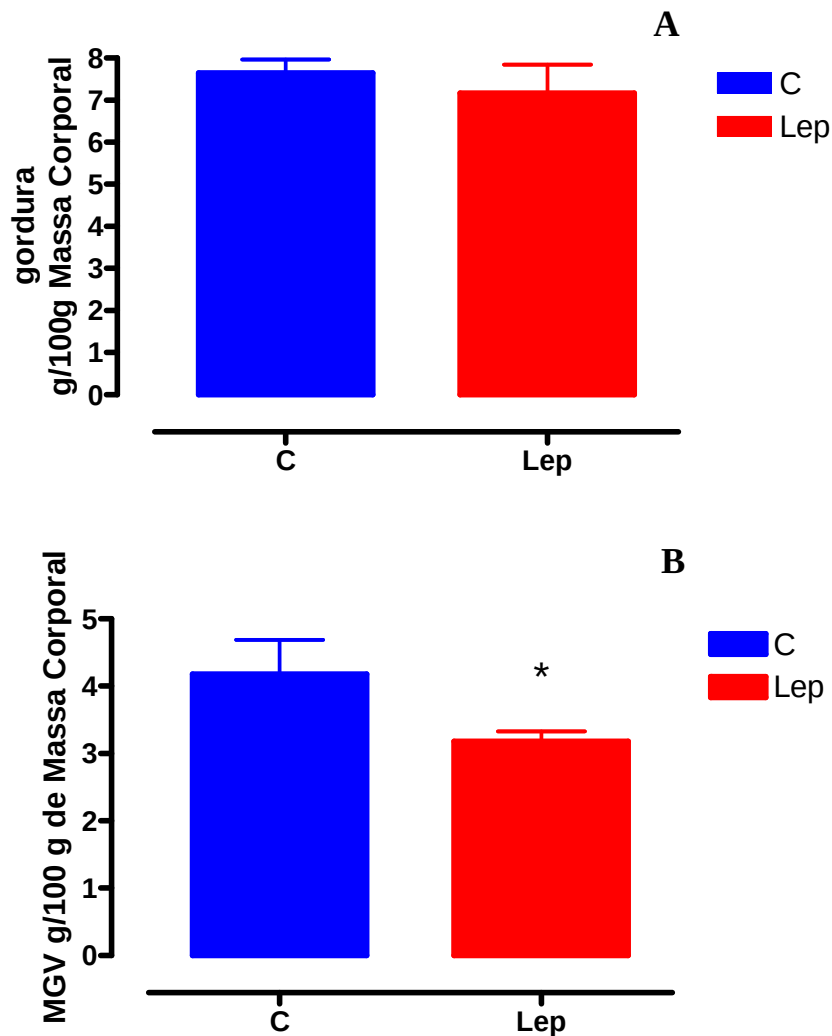


Figura 14 – Gordura total relativa a massa corporal (A) e gordura visceral relativa a massa corporal (B) na prole tratada com leptina (8 μ g/100g PC/dia) nos 10 primeiros dias de lactação. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão de 12 animais, * $p<0,05$.

Homeostase Glicêmica

A glicemia não foi programada pela administração de leptina na lactação. Porém, o grupo Lep apresentou aumento de insulina sérica aos 150 dias (+1,1 vezes, $p<0,05$), assim como diminuição de adiponectina sérica (-44,6%, $p<0,05$) (Fig. 15).

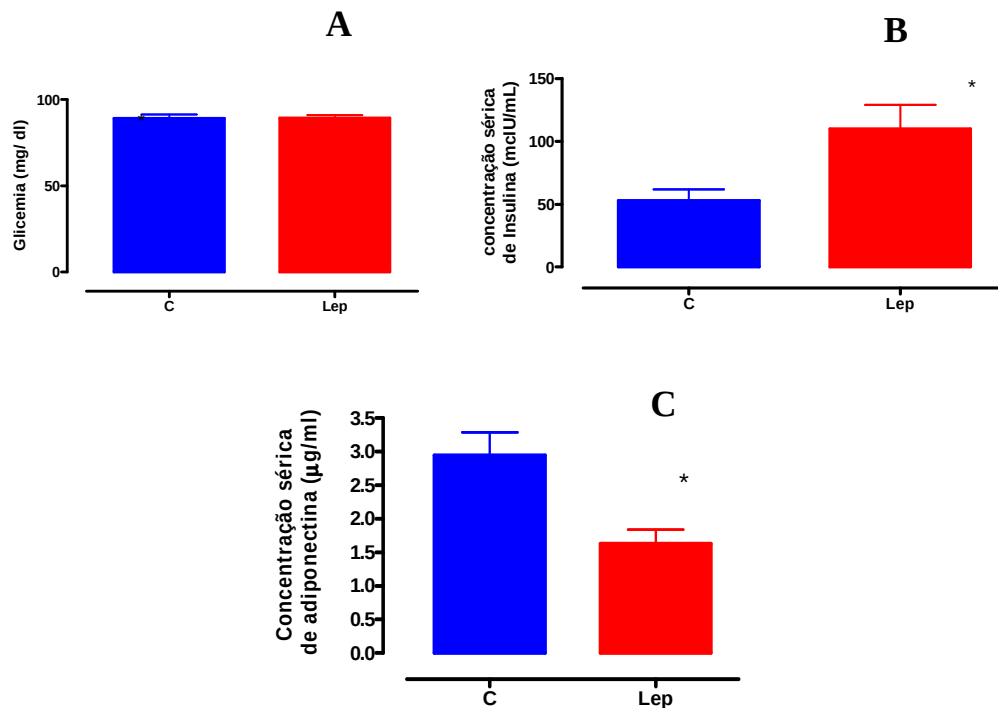


Figura 15: Glicemia (A) e concentrações séricas de insulina (B) e de adiponectina (C) dos grupos controle e Lep aos 150 dias de idade. Grupo leptina - livre acesso à água e ração , recebendo injeção de 8µg de leptina/100g de PC nos 10 primeiros dias de idade; Grupo C - livre acesso à água e ração , recebendo injeção de solução salina. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão de 12 animais, em cada grupo. * $p<0,05$ vs C.

Perfil lipídico

As concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total e HDL colesterol aos 150 dias de idade estão representadas na figura 16. O grupo leptina apresentou maior concentração sérica de triglicerídeos (37%, $p<0.05$). As concentrações séricas de colesterol total e HDLc não foram afetadas pelo tratamento neonatal com leptina

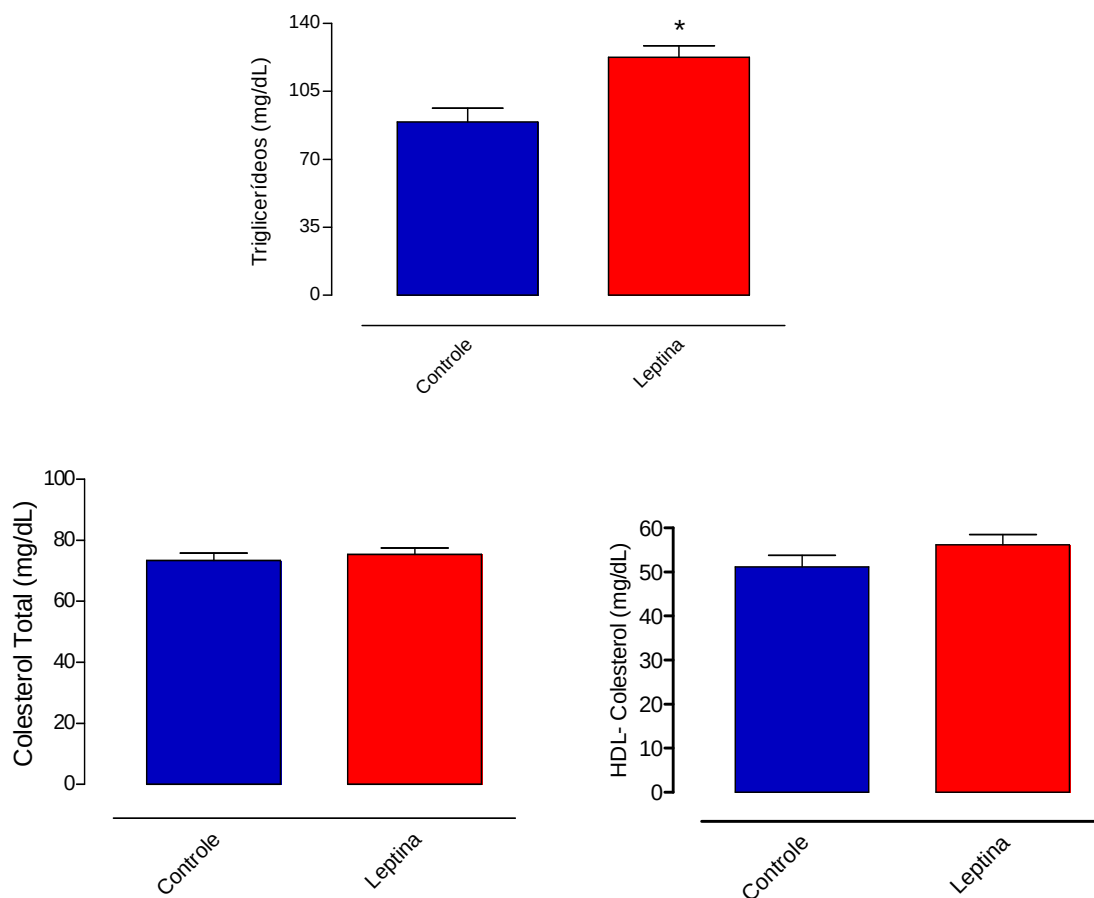
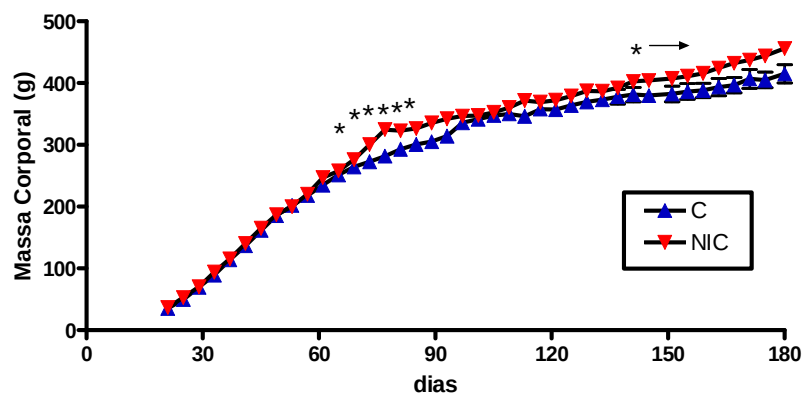


Figura 16: Triglicerídeos e colesterol sérico dos animais do grupo controle (n=12) e programados por leptina (n=12) aos 150 dias de idade. Grupo leptina - livre acesso à água e ração, recebendo injeção de 8µg de leptina/100g de PC nos 10 primeiros dias de idade; Grupo C - livre acesso à água e ração , recebendo injeção de solução salina. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da media. * $p<0.05$.

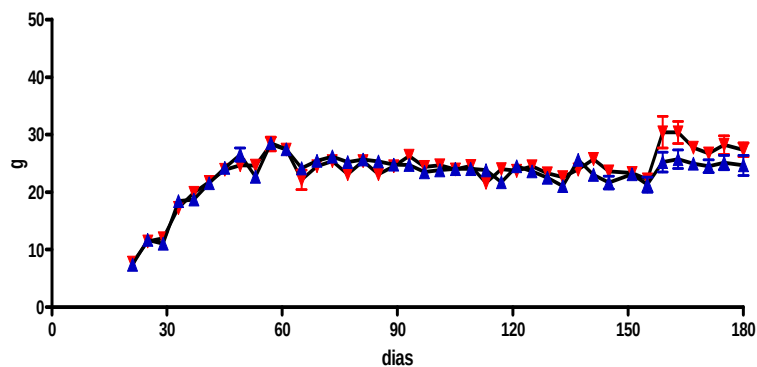
Subprojeto 5 – Exposição materna à nicotina na lactação

Massa corporal e Ingestão alimentar

Entre 75 e 100 dias de vida, detectamos maior massa corporal na prole programada (~ +10%) pela exposição materna à nicotina, sendo que este aumento significativo só reaparece a partir dos 150 dias, alcançando 10% aos 180 dias de idade (fig 17A). A ingestão alimentar não foi diferente por todo o período analisado (fig 17B).



(A)



(B)

Figura 17 : Evolução de massa (A) e ingestão alimentar absoluta (B) da prole controle (C) e nicotina (NIC) do desmame até os 180 dias de vida, n= 30 por grupo. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p < 0,05$.

Composição corporal

Os animais programados pela administração de nicotina às mães na lactação apresentaram maior massa de gordura visceral e total, conforme mostrado na tabela 8. Este aumento permanece mesmo, quando se relaciona a gordura por peso corporal, conforme pode ser visto na figura 18.

Tabela 8: Adiposidade visceral e total em animais adultos cujas mães foram expostas à nicotina na lactação

180 dias		
	C	NIC
MGV	3.66 ± 0.20	4.87 ± 0.52 *
Gordura corporal total	9.01 ± 0.74	12.26 ± 1.17 *

n=10 por grupo. Valores expressos como média ± EPM; p<0,05.

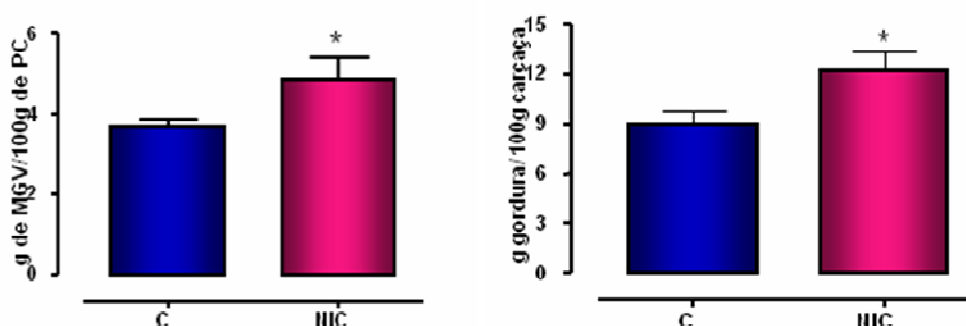


Figura 18 Massa de gordura visceral (MGV) relativa a massa corporal e gordura total relativa a massa da carcaça da prole controle (C) e nicotina (NIC) aos 180 dias de vida, n= 12 por grupo. Valores expressos como média ± EPM, * p<0,05.

Homeostase glicêmica

Não encontramos alteração na glicemia dos grupos controle e nicotina (C: 73.9 ± 2.7 e NIC: 70.2 ± 1.4 mg/dl).

Perfil Lipídico

A administração de nicotina para a mãe durante a lactação não programou modificações no perfil lipídico da prole aos 180 dias de idade (Tabela 9).

Tabela 9: Perfil lipídico da prole adulta programada pela exposição à nicotina na lactação

Proles adultas		
Parâmetros	Controle	Nicotina
Colesterol total (mg/dL)	59.1 ± 1.9	53.3 ± 3.1
HDLc (mg/dL)	12.7 ± 0.8	13.8 ± 1.1
LDLc (mg/dL)	33.6 ± 1.9	32.5 ± 3.4
VLDLc (mg/dL)	12.8 ± 1.1	14.8 ± 4.8
TG (mg/dL)	64.1 ± 5.6	50.6 ± 2.9

Valores representam média $\pm$ EPM de 12 ratos por grupo.

Subprojeto 6 - Desnutrição protéica e calórica em ovelhas durante a lactação

Massa corporal

A desnutrição materna provocou menor ganho de massa corporal primeiro nos cordeiros RP (-42%, $6,62 \pm 0,34$ Kg vs. $11,55 \pm 0,61$ Kg, $p < 0,001$) a partir dos 15 dias de idade, enquanto o RC foi 29% menor na metade final da lactação ($9,2 \pm 0,5$ Kg vs. $11,55 \pm 0,61$ Kg, $p < 0,001$). Aos 45 e 60 dias da lactação, o menor peso nos cordeiros do RP foi acentuado, de modo que foi 24% menor que o grupo RC ($7,6 \pm ,5$ Kg vs. $10 \pm ,53$ Kg, $p < 0,05$), como ilustrado na figura 19.

Os borregos RP e RC tiveram uma massa corporal 25 a 22% menor, respectivamente, que o C durante todo o desenvolvimento (fig 20).

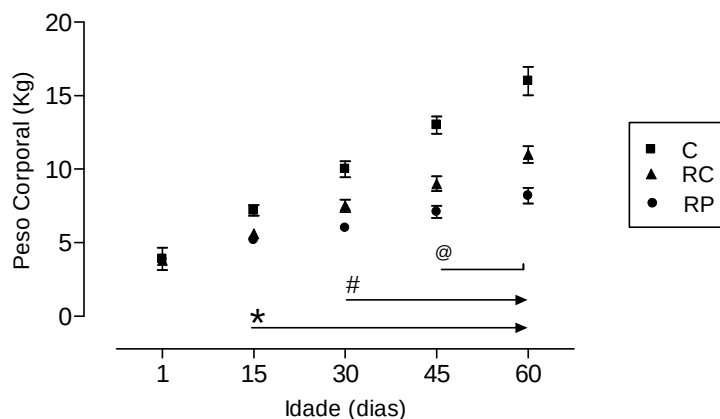


Figura 19 – Evolução do peso corporal dos cordeiros nos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e protéica (RP) na lactação. Os dados são expressos em média $\pm$ EPM, $n = 12$ cordeiros/grupo, sendo *RP vs. C, $p < 0,001$; # RC vs. C, $p < 0,001$ e @RP vs. RC, $p < 0,05$.

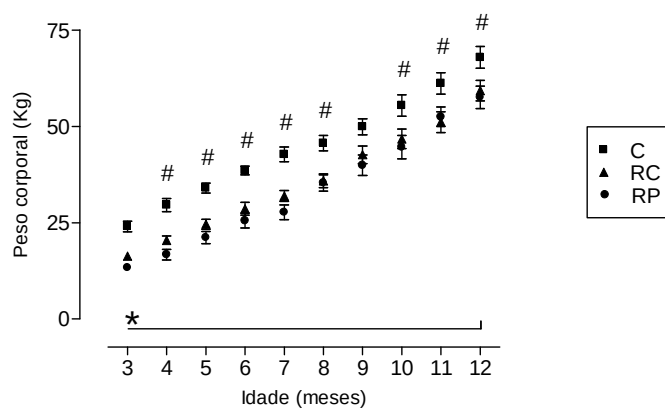


Figura 20 – Evolução do peso corporal dos borregos nos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e protéica (RP) no pós-desmame. Os dados são expressos em média $\pm$ EPM, $n = 8$ borregos/grupo, sendo *RP vs. C, $p < 0,01$; #RC vs. C, $p < 0,05$.

Consumo de Alimento

Constatamos um consumo de alimento relativo a massa corporal, 35% maior no grupo RC aos 6 meses de idade em relação ao C (fig 21), não havendo diferença entre os grupos nas idades subseqüentes.

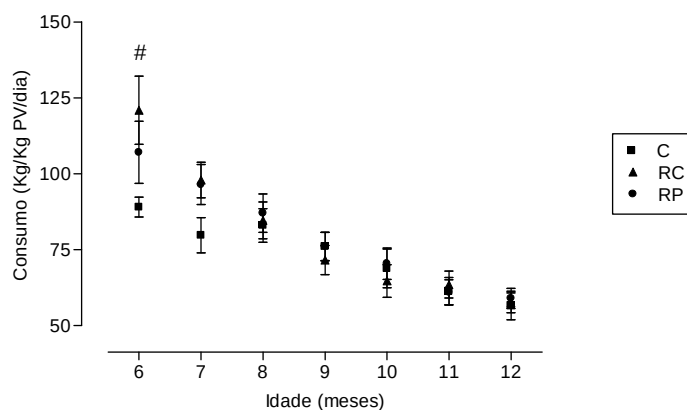


Figura 21 – Consumo de alimentos relativo ao peso corporal dos borregos nos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e protéica (RP) no pós-desmame. Os dados são expressos em média $\pm$ EPM, $n = 8$ borregos/grupo, sendo [#]RC vs. C, $p < 0,01$.

Glicemia

Os cordeiros RP apresentaram menor glicemia aos 45 (-38,6%, $p < 0,05$) e 60 dias (-46%, $p < 0,01$) da lactação em relação ao C. Após o desmame, não encontramos diferença de glicemia dos borregos (fig 22).

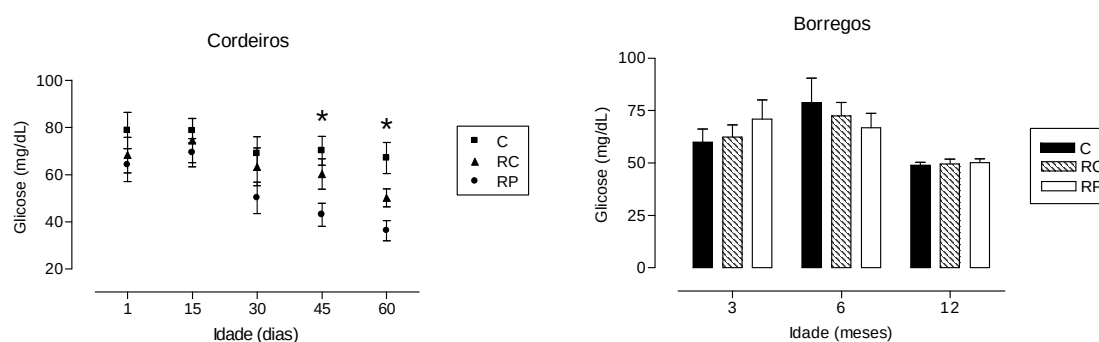


Figura 22 – Glicemia dos cordeiros na lactação e nos borregos até os 12 meses de idade nos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e protéica (RP). Os dados são expressos em média $\pm$ EPM, $n = 12$ cordeiros/grupo, $n = 8$ borregos/grupo, sendo ^{*}RP vs. C, $p < 0,05$.

Proteinemia

Os cordeiros RP aos 60 dias da lactação apresentaram proteína sérica total 8 e 6% menor que C e o RC ($p < 0,05$), respectivamente. A concentração de albumina foi menor no RP (-10,5%, $p < 0,01$) que o C, conforme mostra a figura 23. Não houve diferença significativa no perfil protéico dos borregos.

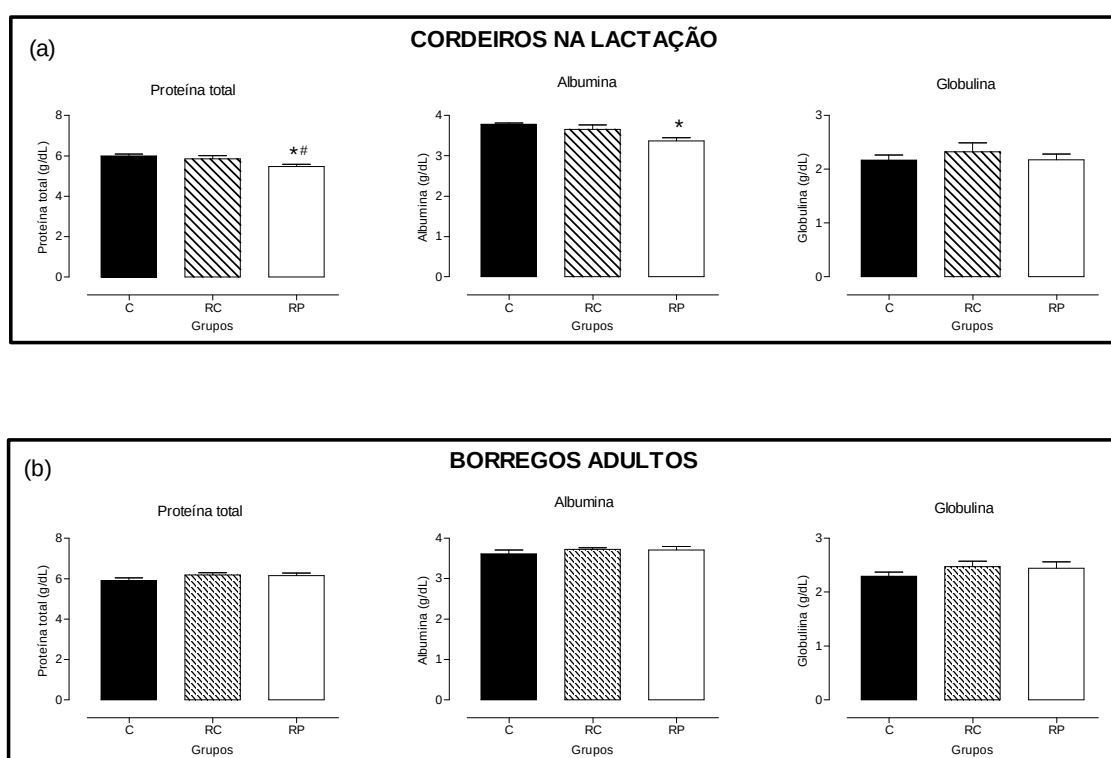


Figura 23 – Evolução da concentração de proteínas totais e suas frações nos (a) cordeiros na lactação e (b) borregos aos 12 meses de idade dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e protéica (RP). Os dados são expressos em média $\pm$ EPM, $n = 12$ ovelhas/grupo, $n = 12$ cordeiros/grupo, $n = 8$ borregos/grupo, sendo *RP vs. C e #RP vs. RC, $p < 0,05$ ou menos.

Perfil lipídico

O perfil lipídico se alterou nos cordeiros na lactação e na vida adulta. Aos 60 dias de idade, o colesterol total foi menor nos cordeiros RP (-27%, $p<0,05$), enquanto a concentração da fração HDLc foi menor no RP (-14,5% vs. C, $p<0,05$) e no RC (-13%, $p<0,05$) e os triglicerídeos foram maiores no RP (+21%, $p<0,05$) e RC (+29%, $p<0,05$) (fig 24). Os borregos aos 12 meses de idade, continuam com colesterol total menor no grupo RP (-17%, $p<0,05$). O mesmo acontecendo com as frações do colesterol, sendo o LDLc 5% menor ($p<0,05$) e o HDLc 22% menor ($p<0,05$), enquanto o grupo RC apresentou, apenas, a fração HDLc menor (-18%, $p<0,05$) (fig 25).

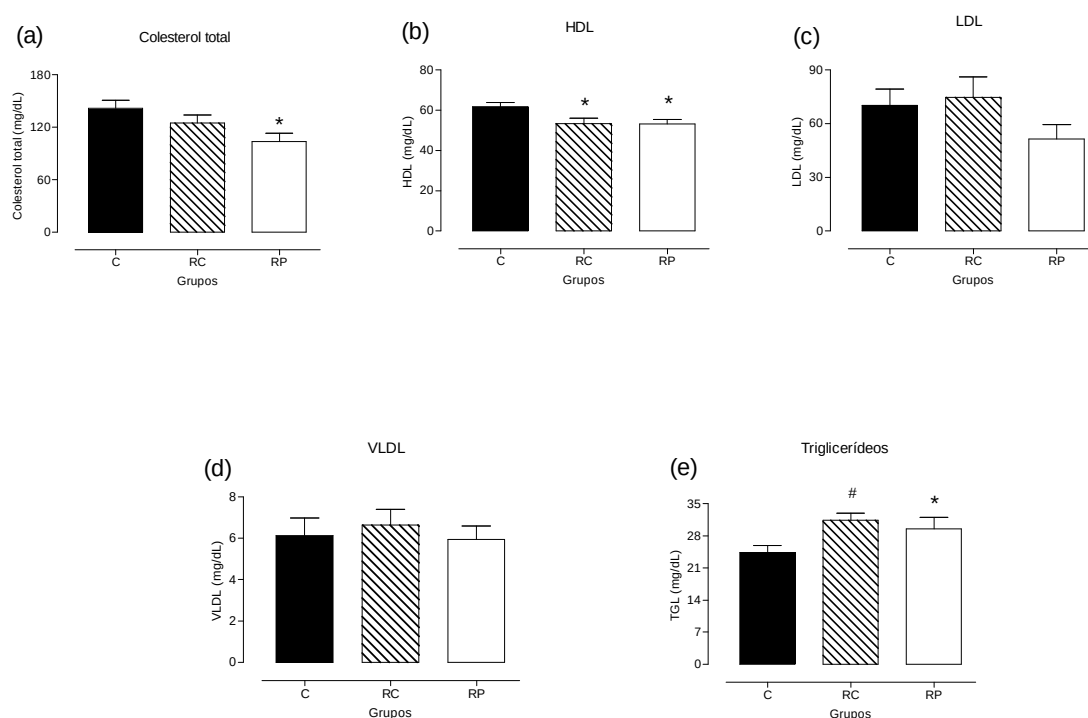


Figura 24 – Lipidograma: (a) colesterol total, (b) HDLc, (c) LDLc, (d) VLDLc e (e) triglicerídeos nos cordeiros aos 60 dias da lactação nos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e protéica (RP). Os dados são expressos em média $\pm$ EPM, n = 12 cordeiros/grupo, * $p<0,05$ ou menos.

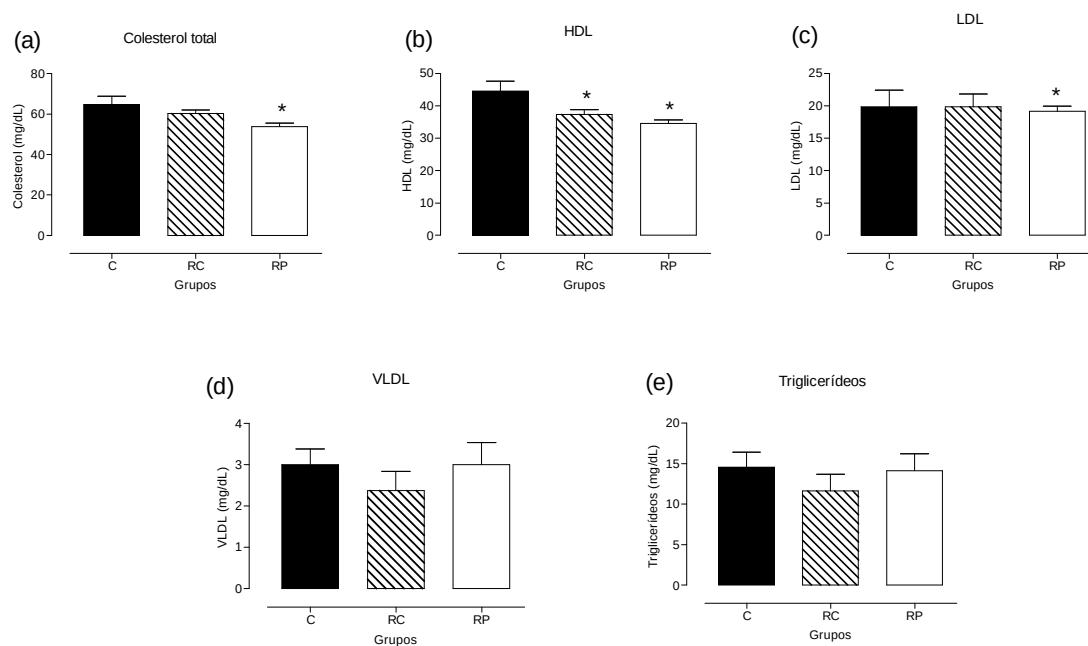


Figura 25 – Lipidograma: (a) colesterol total, (b) HDLc, (c) LDLc, (d) VLDLc e (e) triglicerídeos dos borregos aos 12 meses de idade nos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e protéica (RP). Os dados são expressos em média $\pm$ EPM, n = 8 borregos/grupo, p<0,05 ou menos.

DISCUSSÃO

Subprojeto 1 – Restrição protéica materna na lactação

Confirmando dados anteriores de pesquisas realizadas em nosso laboratório (Passos *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2007; Fagundes *et al.*, 2007) e de outros laboratórios (Zambrano *et al.*, 2005; Bieswal *et al.*, 2006; Prestes-Carneiro *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2008), a prole de ratas lactantes submetidas a RP apresentou menor massa corporal durante todo o período de estudo. Uma parte do menor ganho de massa deve-se à menor ação do hormônio do crescimento (GH), pois verificamos a menor expressão do RNAm para o GH neste modelo (Moura *et al.*, 2007).

Os animais adultos do grupo RP apresentaram menor massa de gordura total e visceral, menor glicemia e insulinemia, com adiponectina sérica normal. Como a secreção de insulina pode estar diminuída, conforme já relatado por outros autores (Moura *et al.*, 1997; Zambrano *et al.*, 2006), o efeito da insulina sobre o tecido adiposo pode ser menor, o que explicaria a lipogênese diminuída. De fato, Garcia-Souza *et al.* (2008) demonstraram menor sinalização da insulina em tecido adiposo, neste modelo de programação. Além disso, Sampaio de Freitas *et al.* (2003) demonstraram que a RP materna na lactação programa para maior atividade da PI3K e maior translocação de GLUT4 em músculo de ratos, o que pode explicar uma menor glicemia associada a menor insulinemia, devido ao aumento da eficiência da ação da insulina.

Não houve programação para disfunções na concentração sérica de proteínas e frações na idade adulta, ao contrário do estudo de Zambrano *et al.* (2006), que encontraram maior concentração sérica de proteínas totais na prole adulta de ratas em desnutrição protéica na lactação. A diferença entre nosso estudo e o do grupo de Zambrano, reside no fato de que eles usaram caseína a 10%, enquanto no nosso houve diluição da dieta com amido, para 8% de proteína de soja.

A desnutrição protéica provocou poucas alterações no perfil lipídico da prole adulta, que pode ser conseqüente a modificações no perfil lipídico do leite (Passos *et al.*, 2000). Mães em desnutrição protéica apresentaram redução no teor protéico do leite, apesar de não terem alteração na concentração total de lipídios. Porém, como estas mães produziram menos leite, a quantidade total de lipídios transferida pelo leite foi

menor. Se algo acontece do ponto de vista de programação, é até um efeito protetor, haja vista haver uma diminuição no colesterol total do grupo cuja mãe foi desnutrida, quando se tornam adultos. Este resultado corrobora achados anteriores de Zambrano *et al.* (2006), em que a restrição protéica na lactação programou para menor concentração sérica de lipídios totais nos animais adultos. Não encontramos outra referência na literatura, comparável ao nosso estudo. Esta alteração pode se dever ao maior efeito da insulina no fígado ou pela ação dos HTs, que se encontram elevados neste modelo experimental (Passos *et al.*, 2002; Dutra *et al.*, 2003; Lisboa *et al.*, 2008) e tem efeito conhecido, aumentando a excreção biliar de colesterol (Berkenstam *et al.*, 2008).

Portanto, resumindo é possível crer que a nossa prole RP tenha desenvolvido uma sensibilidade diferenciada à insulina, apresentando uma maior sensibilidade no hepatócito e no músculo e uma resistência no adipócito.

Subprojeto 2 – Bloqueio da prolactina nos 3 últimos dias de lactação

O encurtamento da lactação, devido à inibição da prolactina materna com bromocriptina, programou para a prole adulta alterações no perfil lipídico que podem ser, em parte, explicadas pelas alterações já previamente relatadas no peso e composição corporal dos animais adultos (Bonomo *et al.*, 2007). Estes animais apresentaram concentrações séricas elevadas de colesterol total, LDLc, VLDLc e triglicerídeos, enquanto o HDLc foi menor e, conseqüentemente, os índices de Castelli encontraram-se elevados. Além disso, o hipotireoidismo observado nestes animais (Bonomo *et al.*, 2008) também esclarece, parcialmente, as alterações no perfil lipídico aqui relatada, desde que é bastante conhecida a associação de hipotireoidismo e dislipidemia (Duntas & Wartofsky L, 2007; Romaldini *et al.*, 2004).

Os animais estudados apresentaram maior massa corporal total sem alteração de ingestão alimentar (Bonomo *et al.*, 2007), o que caracteriza um provável hipometabolismo. Vários fatores podem afetar o gasto energético neste modelo experimental, tais como: estado nutricional e hormônios, dentre eles, insulina, leptina, HTs e catecolaminas.

A prole BRO adulta exibiu acúmulo de gordura na região abdominal (MGV), sendo esta fortemente relacionada com elevação de fatores de risco para DCV e resistência à

insulina. A gordura visceral produz mais citocinas pro-inflamatórias (como TNF- α e interleucina 6) e menos adiponectina. Tais alterações induzem a resistência insulínica e atuam na patogênese da disfunção endotelial e subsequente aterosclerose (Hamdy *et al.*, 2006). Também é bastante conhecida a relação entre resistência à insulina e dislipidemia.

Como descrito, excesso de gordura visceral está associado à resistência à insulina (Belfiore & Iannello, 1998); como resultado desta resistência, há hiperglicemia. Nossos achados estão de acordo com estas informações, pois detectamos maior glicemia e IRI, apesar da insulinemia normal, evidenciando a resistência insulínica na vida adulta neste modelo experimental.

A adiponectina é a adipocitocina associada ao aumento da sensibilidade insulínica (Shimomura *et al.*, 1999; Berg *et al.*, 2001; Fruebis *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2001). Ao contrário da leptina, que é proporcional à massa adiposa, a concentração de adiponectina é maior em mulheres e em indivíduos eutróficos magros (Arita *et al.*, 1999). Com base na redução de adiponectina encontrada nos animais BRO, que pode ser relacionada com a maior adiposidade, reforçamos a hipótese de resistência à insulina.

Vários estudos mostram hiperleptinemia em obesos (Lonngvist *et al.*, 1995; Considine *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1996; Caro *et al.*, 1996), que, portanto, apresentam resistência à leptina (Maffei *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 1997; Halaas *et al.*, 1997). A injeção de leptina em ratos adultos reduz a ingestão alimentar após 2 horas (Martin *et al.*, 2000); em nosso modelo, os animais adultos BRO não apresentaram alteração no consumo após a administração aguda e sistêmica do hormônio, caracterizando uma resistência hipotalâmica ao seu efeito anorexigênico (Bonomo *et al.*, 2007). Podemos justificar a resistência à leptina dos animais adultos do grupo BRO, pela sua hiperleptinemia, provavelmente, desde o desmame (Bonomo *et al.*, 2005). Estes dados se assemelham aos observados em dois outros modelos de programação desenvolvidos em nosso laboratório: injeção de leptina na lactação, onde verifica-se, na vida adulta, hiperleptinemia, aumento de peso corporal e resistência ao efeito anorexigênico (Cravo *et al.*, 2002; Lins *et al.*, 2005; Toste *et al.*, 2006a) e modelo de desnutrição materna na lactação (Passos *et al.*, 2004).

A resistência à leptina em obesos pode ocorrer por diversas razões. A leptina pode não conseguir atravessar a barreira hemato-encefálica (Burguera *et al.*, 2000;

Banks *et al.*, 2001; Jéquier, 2002), pode ocorrer *down-regulation* do seu receptor ou sua sinalização intracelular pode estar inibida (Considine *et al.*, 1996; Chua *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2000, Korner *et al.*, 2001).

É descrito uma associação entre resistência à leptina e resistência à insulina, devido ao *cross-talking* nas vias de sinalização de insulina e leptina, em especial no aumento da SOCS3 (Supressor de Sinalização de Citocinas 3), que bloqueia a fosforilação da JAK2, segundo mensageiro da via de sinalização da leptina e também da PI3K, enzima importante na via de sinalização de insulina (Howard & Flier, 2006).

Recentemente, Quijada *et al.* (2008) mostraram uma relação direta entre a leptinemia e a relação TG/HDLc, em crianças obesas, entre 6 e 12 anos de idade. Da mesma forma, Nakatani *et al.* (2008) encontraram relação direta da leptina sérica com o índice HOMA e triglicerídeos e indireta com o HDLc. Em uma população de brasileiras de origem japonesa, maiores de 30 anos de idade, Almeida-Pititto *et al.* (2005) encontraram uma relação direta entre leptinemia e resistência à insulina, mas não encontraram relação com triglicerídeos e HDLc. Porém, em mulheres pós-menopausa, Wildman *et al.* (2008) encontraram uma relação direta entre a leptinemia e a resistência à insulina e indireta com o HDLc sérico. Assim, a relação leptina/lipídios séricos parece depender do sexo e da idade do indivíduo.

Também a adiponectinemia parece depender do sexo e da idade na sua relação com a resistência à insulina. Em uma população de japoneses, Nakatani *et al.* (2008) não encontrou relação entre adiponectina sérica e índice HOMA, em adolescentes, apesar de encontrar relação inversa em adultos. Da mesma forma, o grupo de mulheres pós-menopausa apresentou relação inversa entre a adiponectina e a resistência a insulina e relação direta com os baixos níveis de HDLc (Wildman *et al.*, 2008).

Os dados em ratos da interação das adipocitocinas com o metabolismo lipídico são ainda escassos. Recentemente Huang *et al.* (2007), demonstraram que a leptina corrige as alterações no perfil lipídico causada pela administração de sacarose. Estes animais desenvolvem esteatose hepática e aumento de triglicerídeos e VLDL c, que são corrigidos pela administração de leptina. Entretanto, a leptina foi incapaz de corrigir a resistência à insulina observada nos animais tratados com sacarose. Assim, no nosso modelo de programação pelo bloqueio da prolactina ao final da lactação, a resistência central à leptina (Bonomo *et al.*, 2007), também deve comprometer periféricamente o

efeito da leptina sobre o metabolismo lipídico, visto que , apesar da hiperleptinemia, temos hipertrigliceridemia.

Da mesma forma, a leptina corrige as alterações no metabolismo de colesterol em ratos com resistência parcial à leptina por mutação no receptor deste hormônio (ratos Zucker fa/fa). Estes animais desenvolvem obesidade e apresentam deficiência na excreção de colesterol que leva à formação de cálculos biliares. Nestes animais, a injeção de leptina reduz a formação de cálculos biliares e aumenta a excreção de colesterol, por diminuir a expressão da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase e aumentar a da esterol 27 -hidroxilase e colesterol 7 α -hidroxilase, levando à diminuição na biossíntese de colesterol, com redução de LDLc e aumento do catabolismo de sais biliares (VanPatten *et al.*, 2001). Portanto, no nosso modelo o aumento do colesterol e do LDLc, na presença de hiperleptinemia, se justifica se considerarmos a resistência a ação deste hormônio.

A função tireóidea normal é essencial para regular o metabolismo lipídico. O estado funcional tireóideo influencia as atividades noradrenérgicas e lipolítica no tecido adiposo abdominal subcutâneo *in vivo* (Levey & Klein, 1990; Haluzik *et al.*, 2003) e há evidências de que este efeito lipolítico possa, em parte, ser mediado pelas catecolaminas (Haluzik *et al.*, 2003). Podemos relacionar o hipometabolismo à baixa concentração de T₃, pois os HTs são conhecidos por sua ação estimuladora do metabolismo e da termogênese (Jameson, 2001). Assim, neste modelo experimental, o hipotireoidismo central (Bonomo *et al.*, 2008), provavelmente devido à resistência à leptina, pode ter sido responsável pela menor taxa metabólica basal destes animais, promovendo um menor gasto energético e favorecendo a deposição de gordura corporal. Conforme já mencionado, os animais adultos programados pelo bloqueio da lactação exibem hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, maior fração LDL c, menor fração HDLc e aumento dos índices de aterogenicidade, ocasionado um risco maior de desenvolvimento de DCV (Després, 1991), fatores estes que podem também estar associados à diminuição da função tireóidea (DeGroot & Jameson, 2005).

Resumindo, podemos dizer que a desnutrição neonatal provocada pela inibição da produção de leite programou para aqueles animais adultos: obesidade com acúmulo de adiposidade central e total, alterações na composição corporal, resistência central e periférica à leptina, resistência à insulina e alterações do perfil lipídico.

Subprojeto 3 – Supernutrição por redução do tamanho da ninhada

Como já descrito na literatura, animais criados em ninhadas reduzidas (três a quatro filhotes por lactante), apresentam maior massa corporal quando comparados àqueles criados em ninhada inteiras (dez a 12 filhotes). Nossos dados mostram uma grande diferença de massa (45%) ao desmame e que vai se reduzindo (18%) até os 180 dias de vida. A análise da composição corporal demonstrou que a superalimentação pós - natal leva ao maior ganho de massa, principalmente, devido ao aumento na gordura corporal, sendo este aumento devido, fundamentalmente, à gordura visceral.

Corroborando nossos dados, estudos experimentais (Dubuis *et al.*, 1996) e clínicos (Fiorotto *et al.*, 1991) demonstram que a massa corporal total é altamente correlacionada com a adiposidade corporal. Outros trabalhos , com este mesmo modelo experimental, também revelam claramente um aumento na gordura corporal total avaliada pelo método da carcaça de animais jovens e adultos (Fiorotto & Davies, 1997; Boullu-Ciocca *et al.*, 2005). É sugerido que o maior depósito de gordura dos animais criados em ninhadas reduzidas esteja relacionado ao aumento na atividade de enzimas lipogênicas nos adipócitos (Mozes *et al.*, 2004). Reforçando essa hipótese, Velkoska *et al.* (2005) demonstraram que animais com 120 dias superalimentados após o nascimento, apresentam aumento no mRNA da enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase 1 (11 β -HSD1) nas células adiposas. Esta enzima converte corticosterona em cortisol, que aumenta a lipogênese , principalmente, em adipócitos abdominais (Livingstone *et al.*, 2000). Tem sido bem descrito que o aumento na gordura visceral está diretamente relacionado à síndrome metabólica e à mortalidade cardiovascular (Barroso *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2003; Ribeiro-Filho *et al.*, 2006).

O aumento na taxa de crescimento dos filhotes criados em ninhadas reduzidas pode ser influenciado não só pelo aumento de 20% a 30% no consumo de leite (Morris *et al.*, 2005), mas também por alterações na composição lipídica do leite materno. Fiorotto *et al.* (1991) e Mozes *et al.* (2004), demonstraram maior concentração de lipídios no leite de mães que amamentavam três ou quatro filhotes (ninhada reduzida), comparado àquelas que amamentavam 16 filhotes (ninhadas grandes). Portanto, a composição do leite, associada às alterações hormonais e enzimáticas, pode ser um dos fatores

determinantes das diferenças metabólicas e corporais existentes entre os animais criados em ninhadas de diferentes tamanhos.

Além de alterar a adiposidade corporal, os animais superalimentados na lactação apresentaram hiperfagia desde o desmame até os seis meses de idade. Esta persistente hiperfagia pode ser consequência de um distúrbio no mecanismo de *feedback* negativo da insulina, acompanhado de má formação do núcleo hipotalâmico ventromedial, região envolvida no controle da ingestão alimentar e da massa corporal (Oomura, 1983; Schwartz *et al.*, 1992). Plagemman *et al.* (1999a) defendem a idéia de que o sobrepeso e a hiperfagia também podem se dever à redução na sensibilidade à leptina no hipotálamo desses animais. Normalmente, a injeção de leptina reduz a ingestão alimentar, porém em vários tipos de obesidade em animais experimentais e em seres humanos, observa-se um quadro de hiperfagia, apesar de hiperleptinemia, sugerindo o desenvolvimento de resistência a esse hormônio (Levine & Rout, 1996; Mantzoros, 1999).

Não encontramos alteração na homeostase glicêmica em nosso grupo experimental. Entretanto, estudos anteriores demonstraram que os animais desse modelo experimental apresentam, aos 21 dias de vida, normoglicemia acompanhada de hiperinsulinemia (Plagemman *et al.*, 1999a; Plagemman *et al.*, 1999b, Pereira *et al.*, 2006) sendo que, aos oito meses, a hiperinsulinemia já passa a ser acompanhada de hiperglicemia e hipertensão, componentes da síndrome metabólica (You *et al.*, 1990; Plagemman *et al.*, 1992). É possível, que pelo fato dos nossos animais, ainda terem seis meses de idade, estas alterações não estejam implantadas.

Os animais superalimentados na lactação programaram, na idade adulta, para menor concentração sérica de albumina e maior de globulina, sem alteração das proteínas totais. Esta inversão da relação albumina/globulina está associada a doenças renais, tais como a síndrome nefrótica. Portanto, seria interessante investigar a função renal destes animais. Já foi demonstrado que a superalimentação na lactação leva a hipertensão arterial aos dois meses (Boubred *et al.*, 2007) e aos 8 meses de idade (Plagemann *et al.*, 1992), o que realmente nos leva a concluir que esta manipulação no tamanho da ninhada programa para maior risco cardiovascular na vida adulta. Curiosamente, esse perfil de redução de albumina e aumento de globulina foi encontrado nos animais superalimentados na idade adulta, indicando um possível quadro de inflamação crônica, o que já é bem descrito em indivíduos obesos. Corroborando esta

idéia, Bourbred *et al.* (2007), mostraram que aos 12 meses de vida, os animais superalimentados apresentam aumento na taxa de excreção renal de proteína, conseqüentemente, levando à redução sérica de albumina. Neste mesmo estudo, os autores descreveram que os animais superalimentados aos 22 meses de idade desenvolvem glomeruloesclerose, o que pode ser conseqüência da elevação na pressão arterial sistólica observada desde os dois meses de vida.

Ao contrário dos modelos anteriores, a diminuição da ninhada programou somente uma menor concentração de HDLc na idade adulta. Isto produziria um potencial maior risco de aterogenicidade. Hahn (1984) relatou que a redução da ninhada produziu aumento de colesterol em ratos adultos. Neste modelo, a ninhada foi reduzida para quatro animais e comparada com ninhadas de 14 animais. Duff e Snell (1980) mostraram que animais criados em ninhadas pequenas, apresentavam, quando adultos, super-expressão de enzimas hepáticas envolvidas na síntese de lipídios, tais como: a enzima málica, a glicose-6-fosfato desidrogenase, ácido graxo sintetase e ATP -citrato ligase.

As concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total e LDLc não diferiram entre os grupos nesta idade. Esta relação de aumento na gordura central e não alteração das frações lipídicas, comparada a modelos experimentais induzidos por dietas ricas em gorduras ou seres humanos obesos, pode se dever ao fato da alimentação após desmame, ser com dieta comercial padrão, ou seja, pobre em gordura saturada e açúcar, componentes dietéticos que estão diretamente relacionados ao aumento na síntese endógena de LDLc e triglicerídeos. Assim, para produzir alterações no perfil lipídico, teríamos que oferecer dietas hiperlipídicas logo após o desmame.

Por outro lado, em estudos de desnutrição por aumento da ninhada, Lopez - Soldado *et al.* (2006) encontraram que a prole adulta proveniente de ninhadas grandes (16 animais) apresentava menores concentrações séricas de AGLs, triglicerídeos e VLDLc, mostrando uma programação pela desnutrição calórica.

Subprojeto 4 – Administração de leptina nos dez primeiros dias de vida

Nossos resultados confirmam dados anteriores de nosso laboratório em que a administração de leptina nos dez primeiros dias de vida programa para maior massa corporal e hiperfagia (Oliveira Cravo *et al.*, 2002). Este resultado foi confirmado,

posteriormente, por Vickers *et al.* (2008). Tal efeito parece depender da via de administração, haja vista que, por via oral, a leptina previne o ganho de peso em animais alimentados por dieta rica em lipídios (Pico *et al.*, 2007). Apesar da maior massa corporal, estes ratos apresentam menor adiposidade central e, como a gordura total não se alterou, supõe-se que exista maior massa de gordura subcutânea, ou que ocorra maior acúmulo de gordura intra-hepática ou intramuscular. Ao mesmo tempo, estes ratos apresentaram alterações sugestivas de resistência à insulina, por apresentarem hiperinsulinemia e menor adiponectinemia (Toste *et al.*, 2006b). A menor gordura visceral pode também ser explicada por uma maior ação simpatoadrenérgica, devido ao fato que estes animais programados apresentaram maior secreção de catecolaminas pela adrenal (Trevenzoli *et al.*, 2007).

Poucos trabalhos relatam alterações da concentração sérica de lipídios na programação pela administração de leptina. Em nosso estudo, a administração de leptina nos primeiros dez dias de vida, diretamente na prole, programou para hipertrigliceridemia na idade adulta, o que confirma resultado anterior de nosso próprio grupo (Toste *et al.*, 2006b). A resistência à insulina pode, em parte, explicar a hipertrigliceridemia, já que diabéticos apresentam concentrações séricas elevadas de triglicérides (Despres e Marette, 1994). Por outro lado, o fato destes animais apresentarem maior secreção de catecolaminas (Trevenzoli *et al.*, 2007), sugere maior lipólise, que também poderia explicar este aumento dos triglicérides séricos.

Subprojeto 5 – Exposição materna à nicotina na lactação

A exposição materna à nicotina na lactação programou a prole para maior massa corporal aos 180 dias de idade, à custa de uma maior massa de gordura visceral e total. É importante ressaltar que este aumento da adiposidade corporal (~30%) detectada em nosso estudo ocorre em uma magnitude maior que o aumento de massa corporal (~10%). Ratos expostos à nicotina na gestação e após o nascimento (até o 10º dia de vida) apresentaram sobrepeso a partir dos 35 dias de idade. Apenas no sexo feminino, este aumento de massa persistiu até os 90 dias de vida (Chen & Kelly, 2005). Também foi relatado que o peso corporal de ratos cujas mães foram injetadas com nicotina na

gestação e lactação tornou-se maior aos 70 dias de idade, assim como eles apresentaram maiores valores de massa ventricular cardíaca e das gorduras epididimal, mesentérica e peri-renal aos seis meses de vida (Gao *et al.*, 2005).

Foi relatado que o tratamento com nicotina em ratas adultas modifica o perfil lipídico (Abd el Mohsen *et al.*, 1997). No entanto, não observamos efeitos da exposição materna à nicotina pós-natal sobre as concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total, LDLc, HDLc e VLDLc na prole de ratos machos quando adultos, apesar do seu maior acúmulo de adiposidade corporal. É provável que as concentrações séricas de lipídios da prole NIC adulta não estejam alterados devido ao consumo normal de uma ração equilibrada e, talvez se modificassem, caso expostos a dietas hiperlipídicas, como em trabalhos anteriores, com outros modelos (Vickers *et al.*, 2008, Zambrano *et al.*, 2006).

Subprojeto 6 – Desnutrição protéica e calórica em ovelhas durante a lactação

A diminuição da massa corporal, bem como a hipoproteïnemia apresentada ao fim da lactação, tornaram-se importantes indicadores de balanço energético negativo dos cordeiros lactentes. Apesar do esforço metabólico das ovelhas lactantes RC e RP para assegurar um suprimento nutricional adequado aos seus cordeiros, garantindo a sua sobrevivência à adversidade nutricional, isto não evitou o menor ganho de massa, bem como importantes modificações na lipídemia, proteinemia, glicemia ao longo da lactação nos cordeiros e programação nos borregos. Estes resultados demonstram claramente, os efeitos da desnutrição energética-protéica materna na lactação, causando *imprinting* metabólico e hormonal em sua prole. Do desmame até a idade adulta (12 meses), quando os borregos RC e RP receberam dieta “ad libitum” balanceada, a menor massa corporal e o desenvolvimento de dislipídemia reforçaram a hipótese de programação, como já descrito em estudos realizados em outros modelos animais, particularmente, em ratos e, mais recentemente, em ovinos a partir da gestação.

O ganho de massa corporal dos cordeiros foi menor na lactação nos grupos desnutridos (-61% RP e -41% RC vs. C). Este achado corrobora o estudo de Passos *et al.* (2000), cuja massa corporal da prole de ratas lactantes Wistar desnutridas também foi menor. Porém, na prole das ratas não houve diferença de massa entre os dois grupos

desnutridos, enquanto nos cordeiros, a desnutrição protéica neonatal parece ser mais prejudicial sobre o ganho de massa corporal.

Se associarmos estes resultados à menor concentração de proteína total sérica e suas frações (albumina e globulina) nas ovelhas RP e seus cordeiros, constatamos que a desnutrição protéica nas ovelhas parece ter sido mais severa que a calórica.

Após o desmame, a massa corporal dos borregos RP e RC foi menor que o C (-25 e -22%, respectivamente). Outra questão importante é que houve aumento do consumo relativo nos borregos RC (35% vs. C) aos seis meses de idade, fazendo com que ao final do estudo, o grupo RC se recuperasse mais que o grupo RP. Isto sugere que o *imprinting* ocorrido na massa corporal durante a lactação nos cordeiros RP e RC programaram para uma menor massa corporal na idade adulta. Este resultado é parcialmente semelhante aos trabalhos realizados em nosso laboratório, onde a prole de ratos RP também foi programada para menor massa corporal quando adultos (Passos *et al.*, 2000; Fagundes *et al.*, 2007). Por outro lado, ratos cuja mãe recebeu dieta RC, apresentaram sobrepeso aos 180 dias de vida (Passos *et al.*, 2000). Em nosso experimento, os borregos RC foram programados de forma diferente, ou seja, tiveram menor massa corporal quando adultos, de forma semelhante ao relatado por Husted *et al.* (2007), no qual borregos cujas ovelhas foram submetidas à RC no terço final da gestação, programaram para menor massa corporal aos cinco meses de idade. Todavia, Oliver *et al.* (2002), quando avaliaram cordeiros cujas ovelhas foram desnutridas na gestação, observaram a menor massa dos fetos nos grupos desnutridos apenas ao nascimento, deixando de existir diferença a partir dos três meses de idade. Isto sugere que, em ovinos, a desnutrição materna na lactação exerça um efeito mais importante sobre a massa corporal de seus cordeiros comparado à desnutrição materna na gestação.

Na lactação, os cordeiros RP apresentaram menor colesterol total, o que poderia significar um efeito protetor de aterosclerose, mas estes também apresentam redução do HDLc e aumento de triglicerídeos, o que representa um risco maior de aterosclerose. O grupo RC apresentou menor HDLc e maior triglicerídeos, assim estes animais podem apresentar um risco maior de aterosclerose. Apesar das alterações diferirem no animal adulto, ocorre uma clara programação do perfil lipídico pela desnutrição na lactação, caracterizada pela menor concentração sérica de colesterol total e LDLc no grupo RP e

menor de HDLc em ambos os borregos desnutridos. Novamente, isto sugere que os animais RC apresentam um maior risco de aterosclerose que o borrego RP. Na idade adulta, não houve programação para triglicerídeos séricos. HDLc baixa e triglicerídeos altos são dois componentes importantes da síndrome metabólica (Howard, 1999). Como a exposição a elevadas concentrações séricas de triglicerídeos é cumulativa sobre a parede dos vasos, mesmo que a hipertrigliceridemia nos cordeiros lactentes seja corrigida, o efeito lesivo na gênese da aterosclerose pode permanecer.

Os borregos adultos não apresentaram hiperglicemia, um outro componente da Síndrome Metabólica. Contudo, não avaliamos a resistência à insulina, pois não medimos a concentração sérica deste hormônio em nossos grupos experimentais. Vários estudos com ratos RP têm demonstrado modificações no metabolismo da glicose e, conseqüentemente, na síntese e na secreção de insulina (Moura *et al.*, 1997; Burns *et al.*, 1997; Bertin *et al.*, 1999). Em nosso laboratório, Fagundes *et al.* (2007) mostraram que ratos adultos programados pela RP na lactação apresentaram maior sensibilidade à insulina, indicada pelo menor HOMA, além de menor glicemia e menor insulinemia. Mais recentemente (dados não publicados Fagundes, 2008), detectou-se maior conteúdo de glicogênio em músculo esquelético na prole RP aos 180 dias, reforçando a idéia de maior resposta à ação da insulina. Estes achados corroboram com estudos prévios (Moura *et al.*, 1997; Caldeira Filho & Moura, 2000) que mostraram uma menor secreção de insulina e maior sensibilidade em ratos adultos submetidos a RP pós-natal severa (0% ou 4% de proteína). Zambrano *et al.* (2006) também evidenciaram hipoglicemia e maior sensibilidade à insulina em ratos adultos cujas mães foram submetidas a RP (10% de proteína) na lactação. Além disso, Sampaio de Freitas *et al.* (2003) demonstraram que a RP neonatal programa para maior atividade da PI3K e maior translocação de GLUT-4 em músculos de ratos, o que ajuda a explicar os dados de maior conteúdo de glicogênio muscular. Para justificar este provável aumento da sensibilidade insulínica, seria esperado um aumento na adiponectina sérica nestes ratos adultos programados pela RP na lactação, o que não foi verificado (como já descrito no subprojeto 1). Porém, a adiponectina não é o único fator responsável pela sensibilidade à insulina.

Portanto, a desnutrição em ovelhas lactantes teve efeito na impressão metabólica e hormonal de seus cordeiros, bem como foi capaz de programar para menor massa corporal e dislipidemia na vida adulta e, em parte, estes resultados diferem dos

encontrados em ratos. Estas adaptações à desnutrição neonatal foram diferentes e podem estar associadas ao modelo animal utilizado. A ovelha, assim como a mulher, é unípara, enquanto a rata é múltípara, o que pode contribuir para diferentes adaptações de suas proles frente à desnutrição na lactação apresentando estratégias diferentes de sobrevivência da espécie, através da seleção natural durante a evolução. Talvez seja por isto que a maioria dos estudos com seres humanos desnutridos na lactação, mostre não haver alterações importantes na composição do leite (Méndez *et al.*, 1982). Desta forma, o modelo experimental de programação em ovinos pode ser melhor do que os estudos em roedores, para a extrapolação dos resultados para seres humanos.

Comparação da programação do perfil lipídico nos diferentes modelos de impressão

Os modelos de programação hormonal foram desenvolvidos a partir do fato de que, na desnutrição protéica, encontramos hiperleptinemia e hipoprolactinemia maternas. A prole, ao desmame, também apresentou hiperleptinemia. Assim, os modelos experimentais de bloqueio da prolactina materna ao final da lactação e administração de leptina ao rato neonato, visaram reproduzir a programação causada pela desnutrição protéica neonatal.

O animal programado por restrição protéica materna parece estar protegido de alterações no perfil lipídico que levem a maior aterogenicidade, pois apresentaram somente menor concentração sérica de colesterol total que o do grupo controle. Da mesma forma, a administração materna de nicotina não foi capaz de produzir alterações no perfil lipídico. O animal que recebeu leptina na lactação, programou para hiperinsulinemia, hipoadiponectinemia e hipertrigliceridemia. Porém, o caso mais grave é o da hipoprolactinemia ao final da lactação, pois reproduziu alterações metabólicas compatíveis com a síndrome metabólica, apresentando a prole adulta, hiperinsulinemia, com menor concentração sérica de adiponectina, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e piora nos índices de Castelli. Por outro lado, a superalimentação neonatal parece produzir alterações menos importantes, haja vista que, apesar do aumento da massa de gordura visceral, não se verificou alteração na homeostase glicêmica, e apesar de discreto, contudo significativa, redução de HDLc.

Comparativamente ao rato, a desnutrição de ovelhas lactantes programou poucas alterações em seus borregos adultos. Quando a desnutrição neonatal foi apenas calórica, assemelhou-se, paradoxalmente, à supernutrição neonatal em ratos, pelo fato de que a única alteração foi a redução dos níveis de HDLc. No entanto, os borregos adultos cujas mães sofreram restrição protéica, parecem estar relativamente protegidos, pois, assim como os ratos programados, apresentaram menor colesterol total. Como estes borregos também apresentaram menor HDLc, tal fato pode neutralizar o efeito benéfico da menor concentração de colesterol total.

Assim, este nosso estudo inicial abre grandes perspectivas para se desvendar o mecanismo básico pelo qual, impressões hormonais ou metabólicas, assim como disruptores farmacológicos, podem produzir modificações no perfil lipídico na idade adulta, com possíveis consequências para a saúde do indivíduo.

CONCLUSÕES

O conjunto dos nossos dados nos leva a concluir que modificações nutricionais e hormonais apenas no período crítico da lactação podem produzir futuras alterações no perfil lipídico, repercutindo na saúde do indivíduo adulto.

Os seguintes modelos de programação em roedores protegeram de alterações no perfil lipídico, prevenindo o risco de maior aterogenicidade:

- A restrição protéica materna na lactação, pois a prole adulta programada apresentou menor concentração sérica de colesterol total.

- A exposição materna à nicotina, pois a prole adulta, apesar do sobrepeso, não exibiu alterações do perfil lipídico.

Os seguintes modelos de programação em roedores causaram alterações no perfil lipídico, aumentando o risco de desenvolvimento da Síndrome Metabólica:

- A hipoprolactinemia materna ao final da lactação, pois a prole adulta obesa apresentou hipertrigliceridemia, hipercolestoremia e piora nos índices de Castelli.

- A administração de leptina no início da lactação, pois o animal adulto apresentou hipertrigliceridemia.

- A superalimentação na lactação, pois produziu uma redução de concentração sérica de HDLc na idade adulta, quando os animais são obesos.

A desnutrição materna neonatal em ovinos programou alterações mais graves na restrição calórica que na protéica nos borregos adultos, com destaque para a menor concentração sérica de HDLc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abd el Mohsen MM, Fahim AT, Motawi TM, Ismail NA. (1997). Nicotine and stress: effect on sex hormones and lipid profile in female rats. *Pharmacol Res.* **35**(3): 181-187.
2. Ahima R, Osei SY. (2004). Leptin and appetite control in lip odystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* **89**(9): 4254- 4257.
3. Ahima RS, Kelly J, Elmquist JK, Flier JS. (1999). Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology.* **140**(11): 4923- 4931.
4. Ahima RS, Saper CB, Flyer JS, Elmquist JK. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocr.* **21**(3): 263- 307.
5. Ahrén B, Scheurink AJ. (1998). Marked hyperleptinemia after high-fat diet associated with severe glucose intolerance in mice. *Eur J Endocrinol.* **139**(4): 461- 467.
6. Almeida-Pititto BD, Gimeno SG, Sanudo A, Ribeiro-Filho FF, Ferreira SR; Japanese-Brazilian Diabetes Study Group. (2005). Leptin is associated with insulin resistance in Japanese migrants. *Metab Syndr Relat Disord.* **3**(2): 140- 146.
7. Anguita RM, Sigulem DM, Sawaya AL. (1993). Intrauterine food restriction is associated with obesity in young rats. *J Nutr.* **123**(8): 1421- 1428.
8. Arafa HM. (2005). Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Med Sci Monit.* **11**(7): BR228- 234.
9. Aragão CN, Souza LL, Cabanelas A, Oliveira KJ, Pazos -Moura CC. (2007). Effect of experimental hypo- and hyperthyroidism on serum adiponectin. *Metabolism.* **56**(1): 6- 11.
10. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* **257**(1): 79- 83.

11. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermongant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature*. **394**(6695): 790- 793.
12. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG Jr. (2000). Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem*. **275**(19): 14563-14572.
13. Banks WA. (2001). Leptin transport across the blood–brain barrier: implications for the cause and treatment of obesity. *Curr Pharm Des*. **7**(2): 125- 133.
14. Barker DJ. (2003). The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol*. **18**(8): 733- 736.
15. Barker DJ, Fall CH. (1993). Fetal and infant origins of cardiovascular disease. *Arch Dis Child*. **68**(6): 797- 799.
16. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. (1989). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. **2**(8663): 577- 580.
17. Barroso SG, Abreu VG, Francischetti EA. (2002). The adipose tissue in the genesis of hypertension and atherosclerotic cardiovascular disease. An emerging concept. *Arq Bras Cardiol*. **78**(6): 618- 630.
18. Bayne, K. (1996). Revised guide for the care and use of laboratory animals available. American Physiological Society. *Physiologist*. **39**(4):199, 208- 211.
19. Belfiore F, Iannello S. (1998). Insulin resistance in obesity: metabolic mechanisms and measurement methods. *Mol Gen Metab*. **65**(2): 121- 128.
20. Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. (1993). Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet*. **341**(8841): 339- 341.
21. Benomar Y, Roy AF, Aubourg A, Djiane J, Tao uis M. (2005). Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line. *Biochem J*. **388**(3): 929- 939.
22. Benyshek DC, Johnston CS, Martin JF. (2004). Post -natal diet determines insulin resistance in fetally malnourished, low birth weight rats (F1) but diet does not modify the insulin resistance of their offspring (F2). *Life Sci*. **74**(24): 3033- 3041.
23. Berg AH, Combs T, Du X, Brownlee M, Scherer PE. (2001). The adipocyte -secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*. **7**(8): 947- 953.

24. Bergmann KE, Bergmann RL, Von Kries R, Böhm O, Richter R, Dudenhausen JW, Wahn U. (2003). Early determinants of childhood overweight and adiposity in a birth cohort study: role of breast-feeding. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **27**(2): 162- 172.
25. Berkenstam A, Kristensen J, Mellström K, Carlsson B, Malm J, Rehnmark S, Garg N, Andersson CM, Rudling M, Sjöberg F, Angelin B, Baxter JD. (2008). The thyroid hormone mimetic compound KB2115 lowers plasma LDL cholesterol and stimulates bile acid synthesis without cardiac effects in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**(2): 663- 667.
26. Bertin E, Gangnerau MN, Bailbé D, Portha B. (1999). Glucose metabolism and beta-cell mass in adult offspring of rats protein and/or energy restricted during the last week of pregnancy. *Am J Physiol.* **277**(1): E11- 17.
27. Bieswal F, Ahn MT, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, Remacle C. (2006). The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring).* **14**(8): 1330- 1343.
28. Bioletto S, Golay A, Munger R, Kalix B, James RW. (2000). Acute hyperinsulinemia and very low density and low density lipoprotein subfractions in obese subjects. *Am J Clin Nutr.* **71**(2): 443- 449.
29. Bjorbak C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, Myers MG Jr. (2000). SOCS-3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr-985. *J Biol Chem.* **275**(51): 40649- 40657.
30. Bjorbaek C, Uotani S, Da Silva B, Flier JS. (1997). Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem.* **272**(51): 32686- 32695.
31. Blake KV, Gurrin LC, Evans SF, Beilin LJ, Landau LI, Stanley FJ, Newnham JP. (2000). Maternal cigarette smoking during pregnancy, low birth weight and subsequent blood pressure in early childhood. *Early Hum Dev.* **57**(2): 137- 147.
32. Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MCF, Pazos-Moura CC, Reis AM, Moura EG. (2005). Prolactin inhibition in lactating rats changes leptin transfer through the milk. *Horm Metab Res.* **37**(4): 220- 225.

33. Bonomo IT, Lisboa PC, Pereira AR, Passos MC, de Moura EG. (2007). Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *J Endocrinol.* **192**(2): 339- 344.
34. Bonomo I, Lisboa P, Passos M, Alves S, Reis A, Moura E. (2008). Prolactin inhibition at the end of lactation programs for a central hypothyroidism in adult rat. *J Endocrinol.* [Epub ahead of print]
35. Boubred F, Buffat C, Feuerstein JM, Daniel L, Tsimaratos M, Oliver C, Lelièvre - Pégorier M, Simeoni U. (2007). Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* **293**(6): F1944- 1949.
36. Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M. (2005). Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes.* **54**(1): 197- 203.
37. Brown MS, Goldstein JL. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* **232**(4746): 34- 47.
38. Byberg L, McKeigue PM, Zethelius B, Lithell HO. (2000). Birth weight and the insulin resistance syndrome: association of low birth weight with truncal obesity and raised plasminogen activator inhibitor-1 but not with abdominal obesity or plasma lipid disturbances. *Diabetologia.* **43**(1): 54- 60.
39. Burguera B, Couce ME, Curran GL, Jensen MD, Lloyd RV, Cleary MP, Poduslo JF. (2000). Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood – brain barrier in rats. *Diabetes.* **49**(7): 1219- 1223.
40. Burns SP, Desai, Cohen RD, Hales CN, Iles RA, Germain JP, Going TCH, Bailey RA. (1997). Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest.* **100**(7): 1768- 1774.
41. Butler NR, Goldstein H. (1973). Smoking in pregnancy and subsequent child development. *Br Med J.* **4**(5892): 573- 575.
42. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. (2004). The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am.* **33**(2): 351- 375.
43. Campbell SC, Moffatt RJ, Stamford BA. (2008). Smoking and smoking cessation-

The relationship between cardiovascular disease and lipoprotein metabolism: A review. *Atherosclerosis*. [Epub ahead of print]

44. Carneiro G, Faria AN, Ribeiro Filho FF, Guimarães A, Lerário D, Ferreira SR, Zanella MT. (2003). Influence of body fat distribution on the prevalence of arterial hypertension and other cardiovascular risk factors in obese patients. *Rev Assoc Med Bras*. **49**(3): 306- 311.
45. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV. (1996). Decreased cerebrospinal - fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. **348**(9021): 159- 161.
46. Carnevali JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ. (2001). Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett*. **500**(3): 119- 124.
47. Catalani A, Casoloni P, Scaccianoce S, Patacchioli FR, Spinuzzi P, Angelucci L. (2000). Maternal corticosterone during lactation permanently affects brain corticosteroid receptors, stress response and behavior in rat progeny. *Neuroscience*. **100**(2): 319- 325.
48. Chen WJ, Kelly RB. (2005). Effect of prenatal or perinatal nicotine exposure on neonatal thyroid status and offspring growth in rats. *Life Sci*. **76**(11):1249- 1258.
49. Choi GY, Tosh DN, Garg A, Mansano R, Ross MG, Desai M. (2007). Gender-specific programmed hepatic lipid dysregulation in intrauterine growth-restricted offspring. *Am J Obstet Gynecol*. **196**(5): 477.e1-7.
50. Chua SC, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL. (1996). Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*. **271**(5251): 994- 996.
51. Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*. **278**(5344): 1803- 1805.
52. Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE. (2003). Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes*. **52**(2): 268- 276.

53. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Nyce MR, Magosin AS, Bauer TL, Rosato EL, Colberg J, Caro JF. (1995). Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. *J Clin Invest.* **95**(6): 2986- 2988.
54. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, Mckee LJ, Bauer TL et al. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N Engl J Med.* **334**(5): 292- 295.
55. Cooper AD. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res.* **38**(11): 2173- 2192.
56. Cravo CO, Teixeira CV, Passos MC, Dutra SC, Moura EG, Ramos C. (2002). Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. *Horm Metab Res.* **34**(7): 400- 405.
57. Csaba G. (2000). Hormonal imprinting: its role the evolution and development of hormones and receptors. *Cell Biol Int.* **24**(7): 407- 414.
58. DeGroot LJ, Jameson JL. Endocrinology. (2005) 5^a ed. W. B. Saunders Company, EUA.
59. De Moura EG, Passos MCF. (2005). Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep.* **25**(3/4): 251- 269.
60. De Moura EG, Lisboa PC, Custódio CM, Nunes MT, de Picoli Souza K, Passos MC. (2007). Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *J Nutr Biochem.* **18**(2): 134- 139.
61. Desai M, Hales CN. (1997). Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol Rev Camb Philos Soc.* **72**(2): 329- 348.
62. Després JP. (1991). Lipoprotein metabolism in visceral obesity. *Int J Obes.* **15**(Suppl 2):45-52.
63. Després JP, Marette A. (1994). Relationship of components of insulin resistance syndrome to coronary disease risk. *Curr Opin Lipidol.* **5**(4): 274- 289.
64. DiFranza JR, Lew RA. (1995). Effect of maternal cigarette smoking on pregnancy complications and sudden infant death syndrome. *J Fam Pract.* **40**(4): 385- 394.

65. Dorner G, Plagemann A. (1994). Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res.* **26**(5): 213- 221.
66. Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. (1971). Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta.* **31**(1): 87- 96.
67. Dubuis JM, Deal C, Tsagaroulis P, Clark RG, Van Vliet G. (1996). Effects of 14-day infusions of growth hormone and/or insulin-like growth factor I on the obesity of growing Zucker rats. *Endocrinology.* **137**(7): 2799- 2806.
68. Duarte SF, Francischetti EA, Genelhu VA, Cabello PH, Pimentel MM. (2007). LEPR p.Q223R, beta3-AR p.W64R and LEP c.-2548G>A gene variants in obese Brazilian subjects. *Genet Mol Res.* **6**(4): 1035- 1043.
69. Duff DA, Snell K. (1982). Effect of altered neonatal nutrition on the development of enzymes of lipid and carbohydrate metabolism in the rat. *J Nutr.* **112**(6): 1057- 1066.
70. Duntas LH, Wartofsky L. (2007). Cardiovascular risk and subclinical hypothyroidism: focus on lipids and new emerging risk factors. What is the evidence? *Thyroid.* **17**(11): 1075- 1084.
71. Dutra SC, Moura EG, Rodrigues AL, Lisboa PC, Bonomo I, Toste FP, Passos MC. (2007). Cold exposure restores the decrease in leptin receptors (OB-Rb) caused by neonatal leptin treatment in 30-day-old rats. *J Endocrinol.* **195**(2): 351- 358.
72. Dutra SC, Passos MC, Lisboa PC, Santos RS, Cabanelas AP, Pazos-Moura CC, Moura EG. (2003). Liver deiodinase activity is increased in adult rats whose mothers were submitted to malnutrition during lactation. *Horm Metab Res.* **35**(4): 268- 270
73. Edwards LJ, Coulter CL, Symonds ME, McMillen IC. (2001). Prenatal undernutrition, glucocorticoids and the programming of adult hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **28**(11): 938-941.
74. Elmquist JK, Maratos-Flier F, Saper CB, Flier JS. (1998). Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci.* **1**(6): 445- 450.

75. Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, Trevenzoli IH, Garcia RM, Lisboa PC. (2007). Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr.* **98**(5): 922- 928.
76. Fall CHD, Barker DJP, Osmond C, Winter PD, Clark PMS, Hales CN. (1992). Relation of infant feeding to adult serum cholesterol concentration and death from ischaemic heart disease. *BMJ.* **304**(6830): 801- 805.
77. Fiorotto ML, Burrin DG, Perez M, Reeds PJ. (1991). Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *Am J Physiol.* **260**(6 Pt 2): R1104- 1113.
78. Fiorotto ML, Davis TA. (1997). Food intake alters muscle protein gain with little effect on Na(+)-K(+)-ATPase and myosin isoforms in suckled rats. *Am J Physiol.* **272**(5 Pt 2): R1461- 1471.
79. Fishbeck KL, Rasmussen KM. (1987). Effect of repeated cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum -fed and chronically food-restricted rats. *J Nutr.* **117**(11): 1967- 1975.
80. Flier JS. (1995). The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? *Cell.* **80**(15): 15- 18.
81. Ford SP, Hess BW, Schwoppe MM, Nijland MJ, Gilbert JS, Vonnahme KA, Means WJ, Han H, Nathanielsz PW. (2007). Maternal undernutrition during early to mid - gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. *J Anim Sci.* **85**(5): 1285- 1294.
82. Friedewald, WT, Levy RI, Fredrickson, DS. (1972). Estimation of the concentrations of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**(6): 499- 502.
83. Friedman JM, Halaas JL. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* **395**(6704): 763- 770.
84. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(4): 2005- 2010.

85. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, Scherer P, Rossetti L, Barzilai N. (2002). Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes*. **51**(10): 2951- 2958.
86. Gao YJ, Holloway AC, Zeng ZH, Lim GE, Petrik JJ, Foster WG, Lee RM. (2005). Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. *Obes Res*. **13**(4): 687- 692.
87. Garaulet M, Perex-Llamas F, Fuente T, Zamora S, Tebar FJ. (2000). Anthropometric, computed tomography and fat cell data in an obese population: relationship with insulin, leptin, tumor necrosis factor -alpha, sex hormone-binding globulin and sex hormones. *Eur J Endocrinol*. **143**(5): 657- 666.
88. Garcia-Souza EP, Da Silva SV, Felix GB, Rodrigues AL, de Freitas MS, Moura AS, Barja-Fidalgo C. (2008). Maternal protein restriction during early lactation induces glut4 translocation and mTOR/ AKT activation in adipocytes of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. [Epub ahead of print]
89. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner R, Stoffel, Heim MH, Skoda RC. (1996). Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**(13): 6231- 6235.
90. Ginsberg HN. (2000). Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*. **106**(4): 453- 458.
91. Ginsberg HN. (2002). New perspectives on atherogenesis: role of abnormal triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Circulation*. **106**(16):2137- 2142.
92. Gluckman PD, Hanson MA. (2004). The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. **15**(4): 183- 187.
93. Godfrey KM, Barker DJ. (2000). Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr*. **71**(5 Suppl): 1344S- 1352S.
94. Godfrey K, Robinson S. (1998). Maternal nutrition, placental growth and fetal programming. *Proc Nutr Soc*. **57**(1): 105- 111.
95. Goharkhay N, Sbrana E, Gamble PK, Tamayo EH, Betancourt A, Villarreal K, Hankins GD, Saade GR, Longo M. (2007). Characterization of a murine model of fetal programming of atherosclerosis. *Am J Obstet Gynecol*. **197**(4): 416.e1-e5.

96. Goldstein JL, Brown MS. (1992) Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. *Eur Heart J.* **13**(Suppl B): 34- 36.
97. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* **177**(2): 751- 766.
98. Hahn P. (1984). Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents . *J. Nutr.* **114**(7): 1231- 1234.
99. Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM. (1997). Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**(16): 8878- 8883.
100. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* **269**(5223): 543- 546.
101. Hales CN. (1997). Metabolic consequences of intrauterine growth retardation. *Acta Paediatr Suppl.* **423**: 184-187.
102. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ.* **303**(6809): 1019-1022.
103. Haluzik M, Nedvidkova J, Bartak V, Dostalova I, Vlcek P, Racek P, Taus M, Svacina S, Alesci S, Pacak K. (2003). Effects of hypo - and hyperthyroidism on noradrenergic activity and glycerol concentrations in human subcutaneous abdominal adipose tissue assessed with microdialysis. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**(12): 5605- 5608.
104. Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi E. (2006). Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev.* **2**(4): 367- 373.
105. Hausenloy DJ, Yellon DM. (2008). Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels. *Heart.* **94**(6): 706 - 714.
106. Havel PJ. (2002). Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol.* **13**(1): 51- 59.
107. Henry, JB. Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratoriais. (1995) 18ª ed. Manole, São Paulo, 233- 237.

108. Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV, Moar K, Trayhurn P, Williams LM. (1997). Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun*. **232**(2): 383- 387.
109. Hotamisligil GS. (1999). The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med*. **245**(6): 621- 625.
110. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose -specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **20**(6): 1595- 1599.
111. Howard BV. (1999). Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol*. **84**(1A): 28J- 32J.
112. Howard JK, Flier JS. (2006) Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab*. **17**(9): 365- 371.
113. Huang W, Dedousis N, O'Doherty RM. (2007). Hepatic steatosis and plasma dyslipidemia induced by a high-sucrose diet are corrected by an acute leptin infusion. *J Appl Physiol*. **102**(6): 2260- 2265.
114. Husted SM, Nielsen MO, Tygesen MP, Kiani A, Blache D, Ingvarsen KL. (2007). Programming of intermediate metabolism in young lambs affected by late gestational maternal undernourishment. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **293**(2): E548- 557.
115. James WP. (1996). The epidemiology of obesity. *Ciba Found Symp*. **201**: 1- 11.
116. Jameson LJ. (2001). Mechanisms of thyroid hormone action. In: DeGroot L, Jameson JL. *Endocrinology*. 4^a ed. Philadelphia. 95: 1327- 1344.
117. Jang Y, Lee JH, Cho EY, Chung NS, Topham D, Balderston B. (2001). Differences in body fat distribution and antioxidant status in Korean men with cardiovascular disease with or without diabetes. *Am J Clin Nutr*. **73**(1): 68- 74.
118. Jaquet D, Collin D, Lévy-Marchal C, Czermichow P. (2004). Adult height distribution in subjects born small for gestational age. *Horm Res*. **62**(2): 92- 96.

119. Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. (2000). High triglycerides and low HDL cholesterol and blood pressure and risk of ischemic heart disease. *Hypertension*. **36**(2): 226- 232.
120. Jéquier E. (2002). Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci*. **967**: 379- 388.
121. Jin L, Burguera BG, Couce ME, Scheithauer BW, Lamsan J, Eberhardt NL, Kulig E, Lloyd RV. (1999). Leptin and leptin receptor expression in the normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role of leptin on pituitary cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*. **84**(8): 2903- 2911.
122. Jin L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura RY, Kulig E, Lloyd RV. (2000). Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology*. **141**(1): 333- 339.
123. Jones AP, Friedman MI. (1982). Obesity and adipocyte abnormalities in offspring of rats undernourished during pregnancy. *Science*. **215**(4539): 1518- 1519.
124. Jones AP, Simson EL, Friedman MI. (1984). Gestational undernutrition and the development of obesity in rats. *J Nutr*. **114**(8): 1484- 1492.
125. Julius U. (2003). Influence of plasma free fatty acids on lipoprotein synthesis and diabetic dyslipidemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. **111**(5): 246- 250.
126. Karlsson C, Lindell K, Ottoson M, Sjöström L, Carlsson B, Carlsson LM. (1998). Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensinogen II. *J Clin Endocrinol Metab*. **83**(11): 3925- 3929.
127. Kasim-Karacas SE. (2000). Ethnic differences in the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr*. **71**(3): 670- 671.
128. Khan BB, Flier JS. (2000). Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. **106**(4): 473- 481.
129. Korner J, Savontaus E, Chua SC, Leibel RL, Wardlaw SL. (2001). Leptin regulation of *Agrp* and *Npy* mRNA in the rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol*. **13**(11): 959- 966.
130. Landt M, Gingerich RL, Havel PJ, Mueller WM, Schoner B, Hale JE, Heiman ML. (1998). Radioimmunoassay of rat leptin: sexual dimorphism reversed from humans. *Clin Chem*. **44** (3): 565- 570.

131. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. (1993). Principles of biochemistry. 2^a ed. Worth, New York.
132. Lemonier D, Suquet JP, Aubert R. (1973). Long-term effect of mouse neonatal food intake on adult body composition, insulin and glucose serum levels. *Horm Metab Res.* **5**(3): 223-224.
133. Leshner AI, Litwin VA, Squibb RL. (1972). A simple method for carcass analysis. *Physiol Behav.* **9**(2): 281-282.
134. Levey GS, Klein I. (1990). Catecholamine-thyroid hormone interactions and the cardiovascular manifestations of hyperthyroidism. *Am J Med.* **88**(6): 642- 646.
135. Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR. (1996). Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta - hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia.* **39**(11): 1299- 1305.
136. Lins MC, de Moura EG, Lisboa PC, Bonomo IT, Passos MC. (2005). Effects of maternal leptin treatment during lactation on the body weight and leptin resistance of adult offspring. *Regul Pept.* **127**(1-3): 197- 202.
137. Lisboa PC, Fagundes AT, Denolato AT, Oliveira E, Bonomo IT, Alves SB, Curty FH, Passos MC, Moura EG. (2008). Neonatal low-protein diet changes deiodinase activities and pituitary TSH response to TRH in adult rats . *Exp Biol Med (Maywood).* **233**(1): 57- 63.
138. Livingstone DE, Kenyon CJ, Walker BR. (2000). Mechanisms of dysregulation of 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese Zucker rats. *J Endocrinol.* **167**(3): 533- 539.
139. López-Soldado I, Munilla MA, Herrera E. (2006). Long-term consequences of under-nutrition during suckling on glucose tolerance and lipoprotein profile in female and male rats. *Br J Nutr.* **96**(6): 1030- 1037.
140. Lönnqvist F, Amer P, Nordfors L, Schalling M. (1995). Overexpression of the obese, ob gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med.* **1**(9): 950- 953.
141. Lucas A. (1994). Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch Dis Child.* **71**(4): 288- 290.

142. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med.* **8**(7): 731- 737.
143. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S et al. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* **1**(11): 1155- 1161.
144. Mantzoros CS. (1999). The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Méd.* **130**(8): 671- 680.
145. Martin RL, Perez E, He YJ, Dawson R Jr, Millard WJ. (2000). Leptin resistance is associated with hypothalamic leptin receptor mRNA and protein down regulation. *Metabolism.* **49**(11): 1479- 1484.
146. McMillen IC, Edwards LJ, Duffield J, Muhlhausler BS. (2006). Regulation of leptin synthesis and secretion before birth: implications for the early programming of adult obesity. *Reproduction.* **131**(3): 415- 427.
147. Melmed S, Kleinberg DL. Anterior pituitary. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS. Williams Textbook of Endocrinology. New York: Saunders (2002). 177- 280.
148. Méndez MC, Riet-Correa F, Ribeiro J, Selaive A, Schild AL. (1982). Mortalidade perinatal em ovinos nos municípios de Bagé, Pelotas e Santa Vitória do Palmar, no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* **2**(2): 69- 72.
149. Merkel M, Kako Y, Radner H, Cho IS, Ramasamy R, Brunzell JD, Goldberg IJ, Breslow JL. (1998). Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(23):13841- 13846.
150. Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E. (1999). Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology.* **140**(12): 5995- 5998.
151. Morley R, Leeson Payne C, Lister G, Lucas A. (1995). Maternal smoking and blood pressure in 7.5 to 8 year old offspring. *Arch Dis Child.* **72**(2): 120- 124.

152. Morris MJ, Velkoska E, Cole TJ. (2005). Central and peripheral contributions to obesity-associated hypertension: impact of early overnourishment. *Exp Physiol.* **90**(5): 697-702.
153. Moura AS, Caldeira Filho JS, de Freitas Mathias PC, de Sá CC. (1997). Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* **96**(2): 179- 192.
154. Moura AS, Franco de Sá CCN, Cruz HG, Costa CL. (2002). Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin. *Braz J Med Biol Res.* **35**(5): 617-622.
155. Moura EG, Santos RS, Lisboa PC, Alves SB, Bonomo IT, Fagundes AT, Oliveira E, Passos MC. (2008). Thyroid function and body weight programming by neonatal hyperthyroidism in rats - the role of leptin and deiodinase activities. *Horm Metab Res.* **40**(1): 1- 7.
156. Mozes S, Sefciková Z, Lenhardt L, Racek L. (2004). Obesity and changes of alkaline phosphatase activity in the small intestine of 40 - and 80-day-old rats subjected to early postnatal overfeeding or monosodium glutamate. *Physiol Res.* **53**(2): 177- 186.
157. Nakatani H, Hirose H, Yamamoto Y, Saito I, Itoh H. (2008). Significance of leptin and high-molecular weight adiponectin in the general population of Japanese male adolescents. *Metabolism.* **57**(2): 157- 162.
158. Navarro HA, Seidler FJ, Eylers JP, Baker FE, Dobbins SS, Lappi SE, Slotkin TA. (1989). Effects of prenatal nicotine exposure on development of central and peripheral cholinergic neurotransmitter systems. Evidence for cholinergic trophic influences in developing brain. *J Pharmacol Exp Ther.* **251**(3): 894- 900.
159. Nilsson C, Swolin-Eide D, Ohlsson C, Eriksson E, Ho HP, Björntorp P, Holmäng A. (2003). Reductions in adipose tissue and skeletal growth in rat adult offspring after prenatal leptin exposure. *J Endocrinol.* **176**(1): 13- 21.
160. Nowak KW, Kaczmarek P, Macrowiak P, Ziolkowska A, Albertin G, Ginda WJ, Trejter M, Nussdorfer GG, Malendowicz LK. (2002). Rat thyroid gland expresses

- the long form of leptin receptors, and leptin stimulates the function of the gland in euthyroid non-fasted animals. *Int J Mol Med*. **9**(1): 31- 34.
161. Nüsken KD, Dötsch J, Rauh M, Rascher W, Schneider H. (2008). Uteroplacental insufficiency after bilateral uterine artery ligation in the rat: impact on postnatal glucose and lipid metabolism and evidence for metabolic programming of the offspring by sham operation. *Endocrinology*. **149**(3): 1056- 1063.
 162. Obici S, Feng Z, Tan J, Liu L, Karkanias G, Rossetti L. (2001). Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J Clin Invest*. **108**(7):1079- 1085.
 163. Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L. (2002). Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci*. **5**(6): 566- 572.
 164. Oliveira, E. Composição corporal e função tireoideana em ratos no modelo de programação pela exposição materna a nicotina na lactação. Brasil. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, 2008.
 165. Oliver MH, Breier BH, Gluckman PD, Harding JE. (2002). Birth weight rather than maternal nutrition influences glucose tolerance, blood pressure and IGF-1 levels in sheep. *Pediatr Res*. **52**(4): 516- 524.
 166. Oomura Y. (1983). Glucose as a regulator of neuronal activity. *Adv Metab Disord*. **10**:31- 65.
 167. Ozanne SE, Hales CN. (2002). Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. **13**(9): 368- 373.
 168. Passos MC, Lins MC, Lisboa PC, Toste FP, Bonomo IT, de Moura EG. (2007). Maternal leptin treatment during lactation programs the thyroid function of adult rats. *Life Sci*. **80**(19): 1754- 1758.
 169. Passos MC, da Fonte Ramos C, Dutra SC, Mouço T, de Moura EG. (2002). Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Horm Metab Res*. **34**(1): 40- 43.
 170. Passos MCF, Ramos CF, Moura EG. (2000). Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr Res*. **20**(11): 1603- 1612.

171. Passos MC, Vicente LL, Lisboa PC, de Moura EG. (2004). Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult animals whose mothers were malnourished during lactation. *Horm Metab Res.* **36**(9): 625- 629.
172. Pereira MA. (2006). Weighing in on glycemic index and body weight. *Am J Clin Nutr.* **84**(4): 677- 679.
173. Phillips DI, Fall CH, Cooper C, Norman RJ, Robinson JS, Owens PC. (1999). Size at birth and plasma leptin concentrations in adult life. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **23**(10): 1025- 1029.
174. Phillips D. (2002). Endocrine programming and fetal origins of adult disease. *Trends Endocrinol Metab.* **13**(9): 363.
175. Picó C, Oliver P, Sánchez J, Miralles O, Caimari A, Priego T, Palou A. (2007). The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int J Obes (Lond).* **31**(8):1199- 1209.
176. Pinheiro AR, Salvucci ID, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. (2008). Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clin Sci (Lond).* **114**(5): 381- 392.
177. Pires, L. Composição corporal e função tireoideana da prole programada pela hipoprolactinemia materna no meio da lactação. Brasil. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, 2007.
178. Plagemann A. (2006). Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Horm Res.* **65**(Suppl 3): 83- 89.
179. Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W, Dörner G. (1999). Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res.* **836**(1-2): 146- 155.
180. Plagemann A, Heidrich I, Götz F, Rohde W, Dörner G. (1992). Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol.* **99**(3): 154- 158.
181. Pracyk JB, Seidler FJ, McCook EC, Slotkin TA. (1992). Pituitary-thyroid axis reactivity to hyper and hypothyroidism in the perinatal period: ontogeny of

- regulation and long term programming of responses. *J Dev Physiol.* **18**(3): 105-109.
182. Prestes-Carneiro LE, Laraya RD, Silva PR, Moliterno RA, Felipe I, Mathias PC. (2006). Long-term effect of early protein malnutrition on growth curve, hematological parameters and macrophage function of rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* **52**(6): 414-420.
 183. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS. (2004). Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med.* **10**(5): 524- 529.
 184. Quijada Z, Paoli M, Zerpa Y, Camacho N, Cichetti R, Villarroel V, Arata-Bellabarba G, Lanes R. (2008). The triglyceride/HDL-cholesterol ratio as a marker of cardiovascular risk in obese children; association with traditional and emergent risk factors. *Pediatr Diabetes*. [Epub ahead of print]
 185. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. (1976). Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* **295**(7): 349- 53.
 186. Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. (1999). Obesity at the age of 50y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr.* **70**(5): 811-816.
 187. Reaven GM. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* **37**(12): 1595-1607.
 188. Reaven GM. (1992). The role of insulin resistance and hyperinsulinemia in coronary heart disease. *Metabolism.* **41**(5 Suppl 1): 16- 19.
 189. Reaven GM. (2003). Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia essential hypertension and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**(6): 2399-2403.
 190. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. (1993) AIN -93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN -76A rodent diet. *J Nutr.* **123**(11): 1939-1951.
 191. Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SR, Zanella MT. (2006). Visceral fat and metabolic syndrome: more than a simple association. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* **50**(2): 230- 238.

192. Rodrigues AL, De Souza EP, Da Silva SV, Rodrigues DS, Nascimento AB, Barja-Fidalgo C, De Freitas MS. (2007). Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol.* **195**(3): 485- 494.
193. Romaldini JH, Sgarbi JA, Farah CS. (2004). Subclinical thyroid disease: subclinical hypothyroidism and hyperthyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* **48**(1): 147-58.
194. Sampaio de Freitas M, Garcia De Souza EP, Vargas da Silva S, da Rocha Kaezer A, da Silva Vieira R, Sanchez Moura A, Barja -Fidalgo C. (2003). Up-regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in muscle of rats subjected to maternal undernutrition. *Biochim Biophys Acta.* **1639**(1): 8-16.
195. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest.* **98**(5): 1101- 1106.
196. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**(6778): 661-671.
197. Señarís R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallero R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF. (1997). Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology.* **138**(10): 4501- 4504.
198. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. (1999). Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature.* **401**(6748): 73- 76.
199. Sichieri R, Siqueira KS, Moura AS. (2000). Obesity and abdominal fatness associated with undernutrition early in life in a survey in Rio de Janeiro. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **24**(5): 614- 618.
200. Simões FC, Marques RG, Diestel CF, Caetano CE, Dinis AP, Horst NL, Nogueira Neto JF, Portela MC. (2007). Lipidic profile among rats submitted to total splenectomy isolated or combined with splenic autotransplant. *Acta Cir Bras.* **22**(Suppl 1): 46 -51.
201. Smith JT, Waddell BJ. (2003). Developmental changes in plasma leptin and hypothalamic leptin receptor expression in the rat: peripubertal changes and the emergence of sex differences. *J Endocrinol.* **176**(3):313- 319.

202. Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG, Funanage VL. (1998). Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab.* **83**(5): 1810- 1813.
203. Smoking and Health: Report Of The Royal College Of Physicians Of London On Smoking In Relation To Cancer of the Lung and Other Diseases. (2002). p.36
204. Souza JR. Tese. Programação do peso corporal, metabolismo intermediário e da função tireoideana em cordeiros nascidos de ovelhas com restrição calórica ou protéica na lactação. 2008. Programa de Pós -graduação em Biologia, UERJ.
205. Stansbie D, Brownsey RW, Crettaz M, Denton RM. (1976). Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of acids synthesis and activities of acetyl -coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *Biochem J.* **160**(2): 413- 416.
206. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* **409**(6818): 307- 312.
207. Strbák V, Skultétyová M, Hromadová M, Randusková A, Macho L. (1991). Late effects of breast-feeding and early weaning: seven-year prospective study in children. *Endocr Regul.* **25**(1-2): 53- 57.
208. Tartaglia LA. (1997). The leptin receptor. *J Biol Chem.* **272**(10): 6093- 6096.
209. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB -R. *Cell.* **83**(7): 1263- 1271.
210. Teixeira C, Passos M, Ramos C, Dutra S, Moura E. (2002). Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *J Nutr Biochem.* **13**(8): 493- 498.
211. Teixeira CV, Ramos CD, Mouco T, Passos MC, de Moura EG. (2003). Leptin injection during lactation alters thyroid function in adult rats. *Horm Metab Res.* **35**(6): 367- 371.
212. Toschke AM, Koletzko B, Slikker W Jr, Hermann M, von Kries R. (2002). Childhood obesity is associated with maternal smoking in pregnancy. *Eur J Pediatr.* **161**(8): 445-448.

213. Toste FP, Alves SB, Dutra SC, Bonomo IT, Lisboa PC, Moura EG, Passos MC. (2006a). Temporal evaluation of the thyroid function of rats programmed by leptin treatment on the neonatal period. *Horm Metab Res*. **38**(12): 827- 831.
214. Toste FP, de Moura EG, Lisboa PC, Fagundes AT, de Oliveira E, Passos MC. (2006b). Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr*. **95**(4): 830- 837.
215. Trevenzoli IH, Valle MM, Machado FB, Garcia RM, Passos MC, Lisboa PC, Moura EG. (2007). Neonatal hyperleptinaemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J Physiol*. **580**(Pt. 2): 629- 637.
216. Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoffel M, Friedman JM. (1996). Leptin activation of stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet*. **14**(1): 95- 97.
217. Vanhala M. (1999). Childhood weight and metabolic syndrome in adults. *Ann Med*. **31**(4): 236- 239.
218. VanPatten S, Ranganani N, Shefer S, Nguyen LB, Rossetti L, Cohen DE. (2001). Impaired biliary lipid secretion in obese Zucker rats: leptin promotes hepatic cholesterol clearance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **281**(2): G393- 404.
219. Velásquez-Melendez G, Martins IS, Cervato AM, Fornes NS, Marucci MF, Coelho LT. (1999). Relationship between stature, overweight and central obesity in the adult population in São Paulo, Brazil. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **23**(6): 639- 644.
220. Velkoska E, Cole TJ, Morris MJ. (2005). Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **288**(6): E1236- 1243.
221. Vicente LL, Moura EG, Lisboa PC, Costa AMA, Amadeu T, Mandarim -de-Lacerda CA, Passos MCF. (2004). Malnutrition during lactation is associated with higher expression of leptin receptor in pituitary of the adult offspring. *Nutrition*. **20**(10): 924- 928.
222. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M. (2008). The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight

- gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. *Endocrinology*. **149**(4): 1906- 1913.
223. Vickers MH, Ikenasio BA, Breier BH. (2001a). IGF -I treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming. *Endocrinol*. **142**(9): 3964- 3973.
224. Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA, Breier BH. (2001b). Dysregulation of the adipoinsular axis a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenesis diabetes induced by fetal programming. *J Endocrinol*. **170**(2): 323- 332.
225. Vik T, Jacobsen G, Vatten L, Bakketeig LS. (1996). Pre - and post-natal growth in children of women who smoked in pregnancy. *Early Hum Dev*. **45**(3): 245- 255.
226. Vom Saal FS, Bronson FH. (1980). Sexual characteristics of adult female mice are correlated with their blood testosterone levels during prenatal development. *Science*. **208**(4444): 597- 599.
227. Von Kries R, Toschke AM, Koletzko B, Slikker W Jr. (2002). Maternal smoking during pregnancy and childhood obesity. *Am J Epidemiol*. **156**(10): 954- 961.
228. Walker P, Courtin F. (1985). Transient neonatal hyperthyroidism results in hypothyroidism in the adult rat. *Endocrinology*. **116**(6): 2246-2250.
229. Wang J, Leibowitz KL. (1997). Central insulin inhibits hypothalamic galanin and neuropeptide Y gene expression and peptide release in intact rats. *Brain Res*. **777**(1-2): 231-236.
230. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. (1998). A nutrient -sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*. **393**(6686): 684- 688.
231. Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. (2000). Inhibition of 11beta -hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *Eur J Neurosci*. **12**(3): 1047- 1054.
232. Wideroe M, Vik T, Jacobsen G, Bakketeig LS. (2003). Does maternal smoking during pregnancy cause childhood overweight? *Paediatr Perinat Epidemiol*. **17**(2):171- 179

233. Wildman RP, Mancuso P, Wang C, Kim M, Scherer PE, Sowers MR. (2008). Adipocytokine and ghrelin levels in relation to cardiovascular disease risk factors in women at midlife: longitudinal associations. *Int J Obes (Lond)*. **32**(5): 740- 748.
234. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*. **7**(8): 941- 946.
235. You S, Gotz F, Rohde W, Dorner G. (1990). Early postnatal overfeeding and diabetes susceptibility. *Exp Clin Endocrinol*. **96**(3): 301- 306.
236. Zambrano E, Bautista CJ, Deás M, Martínez-Samayoa PM, González-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz PW. (2006). A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol*. **571**(Pt 1): 221- 230.
237. Zambrano E, Rodríguez-González GL, Guzmán C, García-Becerra R, Boeck L, Díaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW. (2005). A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol*. **563**(Pt 1): 275- 284.
238. Zammit VA. (1996). Role of insulin in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts. *Biochem J*. **314**(Pt 1): 1- 14.
239. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. **372**(6505): 425- 432.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)