



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Fernanda Torres Quitete

Influência da suplementação materna com diferentes tipos de óleos no período de lactação sobre parâmetros endócrino-metabólicos das proles em curto e longo prazos

Rio de Janeiro

2018

Fernanda Torres Quitete

Influência da suplementação materna com diferentes tipos de óleos no período de lactação sobre parâmetros endócrino-metabólicos das proles em curto e longo prazos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira

Coorientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

Q6

Quitete, Fernanda Torres.

Influência da suplementação materna com diferentes tipos de óleos no período de lactação sobre parâmetros endócrino-metabólicos das proles em curto e longo prazos / Fernanda Torres Quitete – 2018.

90 f.

Orientadora: Elaine de Oliveira.

Coorientadora: Patrícia Cristina Lisbôa da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Clínica e Experimental.

1. Obesidade – Metabolismo - Teses. 2. Óleos vegetais - Metabolismo - Teses. 3. Óleos de peixe - Metabolismo – Teses. 4. Alimentos funcionais – Teses. 5. Hormônios – Metabolismo – Teses. I. Oliveira, Elaine de. II. Silva, Patrícia Cristina Lisbôa da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 577.171.4:665.3:665.213

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

.....
Data

Fernanda Torres Quitete

Influência da suplementação materna com diferentes tipos de óleos no período de lactação sobre parâmetros endócrino-metabólicos das proles em curto e longo prazos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2018.

Coorientadora:

Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes -UERJ

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane
Instituto de Nutrição - UERJ

Prof.^a Dra. Andrea Claudia Freitas Ferreira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Karen de Jesus Oliveira
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre me dar força e determinação para conseguir alcançar todos os meus objetivos e sonhos. É sempre com Ele que eu estou e para Ele que eu peço que me ilumine e guarde nos momentos de alegria e, também, de dificuldade.

Aos meus pais, Jorge e Graças, e à minha irmã, Bruna, por estarem sempre do meu lado, me apoiando em todas as minhas decisões. Pela dedicação e amor que sempre me deram, pela atenção e por me entenderem nos momentos em que eu mais precisei.

À minha orientadora Elaine, que me ajudou em diversos momentos na pesquisa, me compreendeu e me ajudou a enfrentar as minhas dificuldades, além de sempre me ouvir nos momentos de desespero e tentar me acalmar e me animar. Agradeço pela contribuição ao meu desenvolvimento profissional e pessoal, por sempre dividir comigo os seus conhecimentos. É uma pessoa que eu tenho como exemplo profissional e de dedicação.

Aos professores, Patricia e Egberto, que sempre contribuíram muito com meu desenvolvimento na área acadêmica, compartilhando seus conhecimentos e me dando a oportunidade de desenvolvimento e aprendizado.

A todo o grupo do LFE, por todo o apoio e por compartilhar todos os momentos de alegria e de preocupação, por todos os debates sobre assuntos acadêmicos, sobre técnicas de laboratório ou assuntos totalmente aleatórios.

Ao meu eterno “Team LFE” que já não está mais completo e nem presente fisicamente todo dia, mas que continua unido e pronto pra tudo mesmo com algumas morando em outra cidade, outro estado e, até país.

À toda a minha família, pelo apoio, amor e palavras de incentivo sempre que eu precisei.

Aos meus amigos de toda a vida que sempre me apoiaram e compreenderam, inclusive, nos momentos de ausência.

Muito obrigada!

RESUMO

QUITETE, Fernanda Torres. *Influência da suplementação materna com diferentes tipos de óleos no período de lactação sobre parâmetros endócrino-metabólicos das proles em curto e longo prazos*. 2018. 90 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Alguns óleos considerados saudáveis são comumente utilizados na alimentação, inclusive em períodos críticos da vida. Assim, avaliamos os efeitos da suplementação materna com os óleos de soja, oliva, peixe e coco na lactação sobre o metabolismo das proles em PN21 e PN180. Ao nascimento, mães Wistar e seus filhotes foram divididos em 4 grupos (Experimento 1): Óleo de Soja (SO, n=09); Óleo de Oliva (OO, n=10); Óleo de Peixe (OP, n=10) e Óleo de Coco (OC, n=10); ou em 3 grupos (Experimento 2): Óleo de Soja (SO, n=09); Óleo de Coco (OC, n=10) e Óleo de Coco + Ração suplementada com óleo de coco (OC+R, n=05). As mães receberam os óleos por gavagem (0,5g/kg PC) durante a lactação. Em PN21 ocorreu o sacrifício de mães e parte da prole. No experimento 2, o grupo OC+R recebeu óleo de coco na ração durante toda a vida. No PN180, todas as proles foram sacrificadas. Em PN 21, as mães do grupo OO apresentaram menor adiposidade, e seus filhotes apresentaram maior peso corporal (PC) e adiposidade. As mães OC apresentaram menor glicemia; os grupos OO, OP e OC apresentaram maior colesterol plasmático; o grupo OO apresentou maiores níveis de triglicerídeos plasmáticos que OS. As mães dos grupos OO, OP e OC apresentaram menor T4 plasmático, e as do grupo OP e OC, maior T3 que OS. As mães OC apresentaram maior conteúdo de triglicerídeos e menor leptina no leite que os outros grupos. As mães OO e OC apresentaram mais colesterol e calorias no leite que OS. Em PN21, os filhotes do grupo OP e OC apresentaram apenas menores níveis de triglicerídeos que OS e OO. Em PN180 (experimento 1) OO e OC apresentaram maior PC e adiposidade que OS, mas só OC apresentou hiperfagia em relação ao OS. A leptina foi maior no plasma de OO e OC em relação a OS, e no tecido adiposo dos grupos OO e OC comparados aos OS e OP. Os grupos OO, OP e OC apresentaram maiores níveis de T3 plasmático, sem alterações em marcadores da função tireoideana (TSH, TR β 1, Dio 1, Dio 2 e UCP-1). No experimento 2, os grupos OC e OC+R tiveram maior PC, sendo que o OC teve aumento de adiposidade e OC+R teve aumento de massa magra. OC apresentou hiperfagia, e OC+R hipofagia. O grupo OC apresentou aumento de leptina no plasma e tecido adiposo em relação a OS e OC+R. O grupo OC+R apresentou menor T4 que OC, e OC apresentou maior T3 e TSH que OS, sem alterar TR β 1, Dio 1, Dio 2 e UCP-1. Os óleos de coco e de oliva foram capazes de alterar a composição do leite materno e provocar alterações endócrino-metabólicas nas proles a curto e longo prazos e a exposição contínua ao óleo de coco durante a vida preveniu a maioria das alterações causadas pela suplementação materna com este óleo.

Palavras-chave: Programação metabólica. Obesidade. Óleo de coco. Óleo de oliva. Óleo de peixe. Óleo de soja. Alimentos funcionais.

ABSTRACT

QUITETE, Fernanda Torres. *Influence of maternal supplementation with different types of oils during lactation period on endocrine-metabolic parameters of offspring in short and long term*. 2018. 90 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Some oils considered healthy has been commonly used, even in critical periods of life. Here, we studied the effects of maternal supplementation with soybean oil, olive oil, fish oil and coconut oil during lactation on the offspring metabolism at PN21 and PN180, and the impact of coconut oil exposure throughout life. At birth, Wistar dams and their pups were divided into 4 groups (Experiment 1): Soybean oil (SO, n=09); Olive Oil (OO, n=10); Fish Oil (FO, n=10) and Coconut Oil (CO, n=10); or 3 groups (Experiment 2): Soybean oil (SO, n=09); Coconut Oil (CO, n=10) and Coconut oil + Chow supplemented with coconut oil (CO+C, n=05). Dams received the oils through gavage (0.5g/kg BW) during lactation. At PN21 dams and some pups were sacrificed. In experiment 2, CO+C group received coconut oil in the chow throughout life. At PN180, the offspring were sacrificed. At PN21, the dams of OO group presented lower adiposity, and its pups presented higher body weight (BW) and adiposity. The CO dams presented lower glycemia; OO, FO and CO dams presented higher plasma cholesterol; OO group presented higher plasma levels of triglycerides than SO. The dams of OO, FO and CO groups presented lower plasma T4 and the FO and CO dams showed higher T3 than SO. The CO dams presented higher triglycerides content and lower leptin in milk than other groups. The OO and CO dams presented more cholesterol and calories in milk than SO. At PN21, pups of FO and CO groups presented only lower triglycerides levels than SO and OO. At PN180 (experiment 1), OO and CO presented higher BW and adiposity than SO, but only CO presented hyperphagia compared to SO. The leptin was higher in plasma of OO and CO compared to SO, and in adipose tissue of OO and CO compared to SO and FO groups. The OO, FO and CO groups presented higher plasma T3, with no changes in thyroid function markers (TSH, TR β 1, Dio 1, Dio 2 and UCP-1). In experiment 2, CO and CO+C groups showed higher BW, however CO had higher adiposity and CO+C had higher lean mass. The CO group presented hyperphagia and CO+C, hypophagia. The CO group presented higher plasma leptin and in the adipose tissue compared to SO and CO+C. The CO+C group had lower T4 than CO, and CO had higher T3 and TSH than SO, with no changes in TR β 1, Dio 1, Dio 2 and UCP-1. Coconut oil and olive oil were able to alter breast milk composition and cause endocrine-metabolic dysfunctions in offspring at short and long term, and the coconut oil exposure throughout life prevented the most of changes caused by maternal supplementation with this oil.

Keywords: Metabolic programming. Obesity. Coconut oil. Olive oil. Fish oil. Soybean oil. Functional foods.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
AGSCM	Ácidos graxos saturados de cadeia média
β 3-AR	Receptor adrenérgico do tipo β 3
BHT	Butil-hidroxitolueno
CEUA	Comitê de Ética para Uso Animal
CHO	Carboidratos
DHA	Ácido docosahexanóico
Dio	Desiodase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPA	Ácido eicosapentanóico
EPM	Erro padrão da média
EVOO	Óleo de oliva extra virgem
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
HFD	<i>High-fat diet</i>
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
IRI	Índice de resistência à insulina
LAT	Transportadores de aminoácidos do tipo-L
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
LIP	Lipídios
MCT	Transportadores de monocarboxilatos
MGV	Massa de gordura visceral
OATP	Transportadores de ânions orgânicos
OC	Óleo de coco
OC+R	Óleo de coco + ração suplementada com óleo de coco

OO	Óleo de oliva
OP	Óleo de peixe
OS	Óleo de soja
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio-1
PC	Peso corporal
PGC1- α	Coativador 1- α do PPAR
PKA	Proteína quinase dependente de AMP-c
PN	Dia pós-natal
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PTN	Proteínas
QTD	Quantidade
Rf	Ração final
Ri	Ração inicial
RIE	Radioimunoensaio
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TBG	Globulina ligadora de tiroxina
TCL	Triglicerídeo de cadeia longa
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
TNF	Fator de necrose tumoral
TR β 1	Receptor do hormônio tireoideano do tipo β
TSH	Hormônio tireotrófico
UCP	Proteína desacopladora
UI	Unidades internacionais
VET	Valor energético total
WB	Western blotting

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	10
1	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	25
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Modelo experimental de programação metabólica por suplementação materna com diferentes tipos de óleos (soja, oliva, peixe e coco) no período da lactação – Experimento 1	28
3.2	Modelo de suplementação materna com óleo de coco (OC) no período da lactação, onde parte da prole continuou recebendo ração com óleo de coco ao longo da vida (OC+R) – Experimento 2	30
3.3	Preparo da ração suplementada com óleo de coco	31
3.4	Eutanásia	32
3.5	Avaliação do estado nutricional	32
3.6	Coleta do leite materno	34
3.7	Composição bioquímica do leite	35
3.8	Determinação de hormônios no leite	35
3.9	Dosagem da glicemia de jejum	35
3.10	Dosagem de colesterol e triglicerídeos plasmáticos	36
3.11	Dosagem de colesterol e triglicerídeos hepáticos	36
3.12	Determinação das concentrações plasmáticas hormonais	36
3.13	Índice de Resistência à Insulina (IRI)	37
3.14	Determinação dos níveis de leptina no tecido adiposo branco retroperitoneal	37
3.15	Análise da expressão de proteínas por Western Blotting	38
3.15.1	<u>Processamento dos tecidos</u>	38
3.15.2	<u>Western Blotting</u>	38
3.16	Análise de expressão gênica por RT-PCR	40
3.17	Análise estatística	40

4	RESULTADOS	41
4.1	Resultados das mães na lactação	41
4.2	Resultados das proles lactentes	46
4.3	Resultados das proles adultas	51
4.3.1	Experimento 1 - proles adultas de mães tratadas com óleo de soja (OS), óleo de oliva (OO), óleo de peixe (OP) e óleo de coco (OC)	51
4.3.2	Experimento 2 - proles adultas de mães tratadas com óleo de coco na lactação (OC) e que continuaram recebendo ração com óleo de coco ao longo da vida (OC+R)	58
5	DISCUSSÃO	66
5.1	Avaliação nutricional e hormonal das mães e do leite materno	66
5.2	Avaliação nutricional e hormonal da prole lactente	69
5.3	Avaliação nutricional e hormonal da prole adulta programada por suplementação materna com diferentes tipos de óleos (soja, oliva, peixe e coco) no período da lactação – Experimento 1	71
5.4	Avaliação nutricional e hormonal das proles adultas de mães tratadas com óleo de coco na lactação e que continuaram recebendo ração com óleo de coco ao longo da vida – Experimento 2	74
	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79

INTRODUÇÃO

Importância das diferentes fontes de óleos alimentares na saúde

A qualidade da alimentação e a busca por novos alimentos que proporcionem melhora no bem-estar e na saúde da população têm sido o foco de diversos centros de pesquisa. Sabe-se que a composição da dieta influencia direta e indiretamente diversos parâmetros endócrino-metabólicos que irão determinar o estado nutricional e de saúde de um indivíduo. Neste âmbito, diversos estudos têm ressaltado a importância do equilíbrio entre os diferentes tipos de lipídios da dieta, bem como a proporção dos diferentes tipos de ácidos graxos a nível sérico e no tecido adiposo e a incidência de distúrbios metabólicos, como resistência à insulina, doenças cardiovasculares e alterações na resposta inflamatória (BUENO et al., 2008; GARLAND et al., 1998; HU; VAN DAM; LIU, 2001). Tem sido mostrado que um alto consumo de ácidos graxos saturados (AGS) aumenta a incidência de resistência à insulina e doenças cardiovasculares, enquanto os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI) têm um efeito protetor contra o desenvolvimento desses distúrbios (HU; VAN DAM; LIU, 2001; SACKS; KATAN, 2002). Nesse contexto, alguns tipos de gordura, como a banha de porco e outras fontes de AGS, começaram a ser menos utilizadas e fontes de AGPI, como o óleo de soja, dentre outros são, atualmente, as principais fontes de gordura da dieta (BLASBALG et al., 2011). Além disso, fontes de AGMI, como o óleo de oliva, também têm sua utilização incentivada como hábito saudável na prevenção de doenças cardiovasculares, obesidade e suas comorbidades (HAMMAD; PU; JONES, 2016).

Ainda nesse contexto, os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6), que são ácidos graxos essenciais, ou seja, não são sintetizados no nosso organismo e precisam ser fornecidos na dieta, são de extrema relevância para o organismo, especialmente durante o desenvolvimento uma vez que são componentes essenciais das membranas fosfolipídicas das células, e um balanço adequado de cada um deles na dieta parece ser o aspecto mais importante no que diz respeito a esses dois tipos de ácidos graxos (REMACLE; REUSENS, 2004; SIMOPOULOS, 2016). É sugerido que a razão n-6:n-3 ideal deve estar o mais próxima possível da unidade (1) e é recomendado que de 5 a 10% da energia consumida seja proveniente de ácidos graxos n-6, enquanto 0,6 a 1,2% seja oriunda de ácidos graxos n-3 (HAMMAD; PU; JONES, 2016; KRIS-ETHERTON et al., 2007). Foi sugerido, ainda, que

um desequilíbrio na razão n6:n3 pode ser importante para o desenvolvimento de algumas doenças como doenças cardiovasculares e câncer em estudos com roedores submetidos à dieta high-fat (FAY et al., 1997; POUDYAL et al., 2012; ROSE, 1997). Existem diversas fontes de n-6 e n-3 e, dentre elas, uma das fontes mais comuns para o n-6 é o óleo de soja e para o n-3 é o óleo de peixe.

Contudo, recentemente, surgiram algumas discussões sobre qual tipo de gordura da dieta seria mais prejudicial com alguns estudos sugerindo uma reavaliação sobre as recomendações vigentes (CHOWDHURY et al., 2014; LAMARCHE; COUTURE, 2014). Alguns estudos sugerem, ainda, que ácidos graxos saturados provenientes de fontes como o óleo de coco ou óleo de palma, os quais são ricos em triglicerídeos de cadeia média (TCM), podem ser benéficos para a prevenção e tratamento de obesidade e síndrome metabólica (MUMME; STONEHOUSE, 2015; NAGAO; YANAGITA, 2010; XUE et al., 2009).

Óleo de soja

O óleo de soja, uma importante fonte de ácidos graxos n-6, muito consumido pela população ocidental proporcionando um aumento de 50% no consumo de n-6 nas últimas duas décadas (BLASBALG et al., 2011; RUSSO, 2009). Este fato tem sido associado com alta prevalência de obesidade, diabetes, intolerância a glicose e resistência à insulina nesta população (DEOL et al., 2015). Além disso, estudos têm mostrado que o n-6 contribui para diferenciação e replicação de preadipócitos, através do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), e aumenta o estoque de lipídios no tecido adiposo (BOON YIN; NAJIMUDIN; MUHAMMAD, 2008; DA COSTA et al., 2011).

No entanto, os dados da literatura são conflitantes com alguns estudos mostrando um efeito benéfico do óleo de soja, em particular dos ácidos graxos n-6, no metabolismo cardiovascular, contribuindo para redução nos níveis de colesterol total e LDL-c, além de melhora na resistência à insulina e redução da pressão arterial. Contudo, cabe ressaltar que estes estudos fizeram comparações com dietas ricas em ácidos graxos saturados e, ainda assim, concluíram que o aporte de n-6 deve contribuir com uma margem de 5 a 10% das calorias da dieta, não excedendo este limite, uma vez que um aporte maior pode ser deletério para o metabolismo devido os seus efeitos proinflamatórios e oxidativos (HARRIS et al., 2009; KRIS-ETHERTON; HECKER; BINKOSKI, 2004; RUSSO, 2009). Todavia, sabe-se

que, atualmente, o consumo de óleo de soja e outras fontes de n-6 é extremamente alto, chegando a uma razão n-6:n-3 de 10:1 a 20:1, o que é indicado como o ponto crucial para o efeito prejudicial deste ácido graxo (PATTERSON et al., 2012; SIMOPOULOS, 2016).

Deol et al. (2015) realizaram um estudo no qual camundongos, ao desmame, foram divididos em cinco grupos de acordo com a dieta a qual foram submetidos por 35 semanas: um grupo controle que recebia dieta com 13% do total de kcal provenientes de lipídios (banha de porco), e 4 grupos que recebiam diferentes tipos de dieta *high-fat* (40% do total de kcal provenientes de lipídeos), uma composta basicamente de óleo de coco (HFD), outra que teve substituição de parte do óleo de coco por óleo de soja (SO-HFD – 21% óleo de coco e 19% óleo de soja) e outras duas que tinham composição lipídica igual às dietas dos grupos HFD e SO-HFD porém ainda recebiam adição de frutose, grupos F-HFD e F-SO-HFD, respectivamente. Este estudo mostrou que os grupos que receberam maior aporte de óleo de soja apresentaram maior ganho de peso, maior adiposidade e intolerância à glicose e resistência à insulina quando comparados aos grupos que receberam dieta composta basicamente por óleo de coco. Além disso, os grupos SO-HFD, independente da adição de frutose, ainda apresentaram maior lesão hepática e *upregulation* de genes relacionados com a obesidade, diabetes, inflamação e câncer em relação aos grupos HFD. Outros estudos semelhantes corroboram estes resultados mostrando que uma dieta rica em óleo de soja tem um efeito deletério sobre o metabolismo quando comparado a outros tipos de óleos, como o óleo de coco e o óleo de peixe (ALVHEIM et al., 2012, 2013; MIDTBO et al., 2013).

Os resultados encontrados nesses estudos sugerem que as recomendações atuais sobre o aumento do consumo de AGPI e redução de AGS podem produzir efeitos cardiovasculares benéficos, no entanto, agravam problemas como obesidade, diabetes, intolerância à glicose, resistência à insulina e desregulação do metabolismo hepático, caso seja consumido em excesso, em virtude de uma maior oferta de n-6 e alterações na razão n-6:n-3, promovendo um maior aporte de ácido linoleico (18:2 n-6) e seu principal metabólito, o ácido araquidônico (20:4 n-6) (DEOL et al., 2015; SIMOPOULOS, 2016). O ácido linoléico é um importante ligante do PPAR γ , podendo atuar na ativação destes receptores e, conseqüentemente, no aumento da diferenciação e replicação de preadipócitos, contribuindo, assim, para o ganho de peso e obesidade (BOON YIN; NAJIMUDIN; MUHAMMAD, 2008; DA COSTA et al., 2011).

Além disso, sabe-se que o ácido araquidônico, proveniente da ação de enzimas elongases e desaturases sob o ácido linoléico, é um substrato para a produção de citocinas proinflamatórias, como interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e outras

moléculas que promovem vasoconstrição e agregação plaquetária podendo, então, induzir aterosclerose, doenças cardiovasculares e obesidade (HAMMAD; PU; JONES, 2016; PATTERSON et al., 2012; RUSSO, 2009). O aumento do consumo de n-6, através do maior aporte de AGPI na dieta, já foi relacionado com o aumento da concentração dessas citocinas pró-inflamatórias, deixando evidente a contribuição deste ácido graxo na gênese da obesidade e de suas comorbidades (PATTERSON et al., 2012).

Óleo de peixe

O óleo de peixe é uma importante fonte de ácidos graxos n-3 de cadeia longa, contendo em sua composição, geralmente, em torno de 25 a 30% de seus lipídios sob a forma de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA). É importante ressaltar que diferentes tipos de peixes contêm quantidades variáveis desses ácidos graxos e podem ter razões EPA:DHA diferentes devido o conteúdo e o tipo de ácidos graxos n-3 serem influenciados por diversos fatores como as características metabólicas de cada peixe, sua dieta, a temperatura da água em que vivem e as estações do ano (CALDER, 2012).

O EPA (20:5 n-3) e o DHA (22:6 n-3) também podem ser sintetizados no organismo humano a partir do ácido α -linolênico (18:3 n-3) através da ação de enzimas elongases e desaturases, no entanto, este ácido graxo está presente somente em óleos vegetais, como óleo de linhaça e, em menor quantidade no óleo de soja, e também em algumas oleaginosas como as nozes (BURDGE; CALDER, 2006).

O óleo de peixe tem sido associado a efeitos benéficos na prevenção da obesidade (BUCKLEY; HOWE, 2010), resistência a insulina, diabetes tipo 2 (KALUPAHANA et al., 2010; NESCHEN et al., 2007; SAMANE et al., 2009; SUNDARAM et al., 2015), doenças cardiovasculares e dislipidemias (BURDGE; CALDER, 2006). O principal efeito antiobesogênico do óleo de peixe parece estar associado à sua capacidade de modular genes envolvidos na oxidação lipídica e na adipogênese no tecido adiposo (BUCKLEY; HOWE, 2010; FLACHS et al., 2005), uma vez que o n-3 parece limitar o acúmulo de gordura e a hipertrofia do adipócito (RACLOT; GROSCOLAS, 1994). Além disso, o n-3 do óleo de peixe pode aumentar a termogênese no tecido adiposo marrom, aumentando a expressão de proteínas desacopladoras-1 (UCP-1) e outros genes envolvidos com a termogênese, como o

receptor adrenérgico β_3 (β_3 -AR) e o coativador 1- α do PPAR (PGC1- α) (BARGUT et al., 2016; TAKAHASHI; IDE, 2000; ZHAO; CHEN, 2014).

No entanto, ainda existem alguns dados inconsistentes na literatura que não sustentam os efeitos benéficos da suplementação com n-3 no que diz respeito a risco cardiovascular apontando fracos efeitos na melhora do perfil lipídico, na fibrinólise e nos níveis do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) (RUSSO, 2009). Um estudo com humanos mostrou que indivíduos com síndrome metabólica que receberam suplementação com 3g de óleo de peixe (cápsulas contendo 180mg EPA e 120mg DHA) por dia, durante 90 dias, não apresentaram melhora nos níveis de colesterol total, LDL-c, HDL-c e nas medidas antropométricas após o tratamento, mostrando que a suplementação com n-3 isoladamente foi ineficaz na melhora dos parâmetros da síndrome metabólica (VENTURINI et al., 2015). Além disso, alguns autores sugerem que a suplementação com ácidos graxos n-3 por tempo prolongado pode aumentar o risco de complicações hemorrágicas devido ao aumento na produção de prostaglandinas e leucotrienos da série ímpar, com menor efeito próinflamatório e coagulante (LAVIE et al., 2009).

Um estudo de Sundaram et al. (2015) analisou a adiposidade e a produção de adipocinas em camundongos C57BL/6 machos submetidos a dieta controle com óleo de milho (16% das calorias de lipídios) e dietas *high-fat* (45% das calorias de lipídios) com diferentes tipos de óleos durante 11 semanas: 1- óleo de milho (baixa concentração de n-3), 2- óleo de peixe (35% das calorias provenientes do óleo de peixe e 10% do óleo de milho, alta concentração de n-3), 3- óleo de linhaça (18% calorias provenientes do óleo de linhaça e 27% do óleo de milho, alta concentração de n-3), 4- óleo de soja (45% das calorias de óleo de soja, concentração adequada de n-3) e 5- óleo de girassol (39% das calorias provenientes de óleo de girassol e 6% de óleo de linhaça, concentração adequada de n-3). Foi observado um aumento de peso corporal e massa adiposa em todos os grupos submetidos à dieta *high-fat* quando comparados à dieta controle e o grupo que recebeu dieta contendo óleo de peixe apresentou aumento na concentração de adiponectina e redução na concentração de leptina tanto plasmática quanto no tecido adiposo, sem alteração dos níveis de insulina quando comparados ao grupo que recebeu óleo de milho, evidenciando um efeito benéfico do óleo de peixe na sensibilidade a insulina nestes animais.

Um outro estudo submeteu camundongos C57BL/6 machos adultos a quatro tipos de dietas durante 8 semanas: dieta controle (grupo SC, com 10% de lipídios), dieta *high-fat* com banha de porco (grupo HF-L, com 50% de lipídios), dieta *high-fat* com banha de porco adicionada de óleo de peixe (grupo HF-L+FO, com 50% de lipídios) e *dieta high-fat* com óleo

de peixe (grupo HF-FO, com 50% de lipídios) e mostrou que o grupo que recebeu a banha de porco apresentou peso corporal elevado, intolerância à glicose associada à expressão reduzida de GLUT4, hipertrigliceridemia, expressão elevada de citocinas pró-inflamatórias e reduzida de PPAR, além de hiperleptinemia com aumento na expressão de marcadores termogênicos (β 3-ADR, PGC1- α e UCP-1). Em contrapartida, os grupos HF-L+FO e HF-FO apresentaram ganho de peso corporal reduzido com normalização da tolerância à glicose e trigliceridemia, além de expressão normal de GLUT-4 e citocinas pró-inflamatórias e, ainda, expressão elevada de PPAR e dos marcadores termogênicos, mostrando um efeito evidente do óleo de peixe na prevenção do acúmulo de gordura corporal, no aumento da termogênese, na melhora da tolerância à glicose e do perfil lipídico (BARGUT et al., 2016).

Óleo de óliva

Outro óleo comumente utilizado para prevenir algumas doenças crônicas é o óleo de oliva, o qual é uma importante fonte de AGMI ômega-9 (n-9). O ácido oléico (18:1 n-9) é o principal AGMI presente na dieta, sendo responsável por 92% do aporte total dos AGMI (HAMMAD; PU; JONES, 2016). Devido às recomendações para redução da ingestão de AGS e para limitar a ingestão de AGPI a 10% da energia da dieta, há um crescente estímulo para o uso de AGMI, uma vez que estes já demonstraram efeitos cardioprotetores expressivos (GILLINGHAM; HARRIS-JANZ; JONES, 2011). A *American Heart Association* recomenda que a ingestão de AGMI seja de até 20% do total de energia, enquanto a *American Diabetes Association* e a *Dietitians of Canada* preconizam que a ingestão seja em torno de 25% do total de lipídios da dieta, a qual deve ser de 20 a 35% do total de energia (HAMMAD; PU; JONES, 2016).

O óleo de oliva é rico em ácido oléico (55 a 83% do total de ácidos graxos), no entanto, também contém quantidades moderadas de ácido palmítico (7,5 a 20%) e esteárico (0,5 a 5%), que são AGS, e uma baixa quantidade de ácido linoléico (3,5 a 21%) e α -linolênico (0 a 0,9%), AGPI. Essa quantidade variável de cada tipo de ácido graxo depende da origem geográfica do óleo de oliva uma vez que sua composição depende do clima, de fatores genéticos e do grau de maturação das azeitonas (ALARCÓN DE LA LASTRA et al., 2001).

O óleo de oliva é a principal fonte de lipídios na dieta do Mediterrâneo e tem sido associado à alta longevidade e baixa incidência de doenças crônicas, particularmente doenças cardiovasculares (SILVA et al., 2015; URPI-SARDA et al., 2012). Este óleo parece, ainda, ter um efeito protetor contra a diabetes (GUASCH-FERRÉ et al., 2015; LÓPEZ et al., 2008), doenças neurodegenerativas (MARTÍNEZ-LAPISCINA et al., 2013), alguns tipos de câncer (BENETOU et al., 2008; SOFI et al., 2010) e obesidade, contribuindo na redução do peso corporal (GALVÃO CÂNDIDO et al., 2017; RAZQUIN et al., 2009). Estes efeitos benéficos do óleo de oliva têm sido associados à presença de componentes antioxidantes como AGMI n-9 e polifenóis que podem contribuir para redução do peso corporal e na prevenção de desordens metabólicas (RAZQUIN et al., 2009).

Um estudo que acompanhou, durante 22 anos, 59.930 mulheres de 37 a 65 anos e 85.157 mulheres de 26 a 45 anos do *Nurse's Health Study* I e II, respectivamente, que não apresentavam, no início do estudo, diabetes, doença cardiovascular e câncer mostrou que a substituição de fontes de lipídios como margarina, manteiga ou maionese por óleo de oliva todos os dias foi associado com um menor risco de diabetes tipo 2 em 5%, 8% e 15%, respectivamente. Adicionalmente, o alto consumo de óleo de oliva, por si só, foi associado a baixo risco de diabetes tipo 2, sugerindo uma importante ação desse óleo na prevenção de distúrbios da homeostase glicêmica (GUASCH-FERRÉ et al., 2015). Estes dados corroboram o estudo de López et al. (2008) no qual foi demonstrado que uma dieta rica em AGMI, provenientes do óleo de oliva, foi capaz de melhorar a função da célula β -pancreática e a sensibilidade à insulina no período pós-prandial quando comparada a dieta rica em AGS.

Razquin et al., em 2009, avaliaram a adiposidade e a capacidade antioxidante total no plasma em 187 indivíduos que permaneceram em um programa de intervenção durante 3 anos no qual os participantes eram orientados a seguir a dieta do Mediterrâneo, com elevada ingestão de óleo de oliva ou de nozes, ou uma dieta convencional com baixa quantidade de lipídios em geral. Foi observado que os grupos que seguiram a dieta do Mediterrâneo, seja com óleo de oliva ou com nozes, apresentaram capacidade antioxidante total maior que o grupo submetido à dieta convencional e este resultado foi associado a uma redução no peso corporal após os três anos de intervenção no grupo com alta ingestão de óleo de oliva. Dessa forma, os autores sugerem que a dieta do Mediterrâneo, em especial o alto consumo de óleo de oliva, foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante com redução no peso corporal e, conseqüentemente, redução do risco cardiovascular nesses indivíduos.

Um estudo recente de Galvão Cândido et al. (2017) avaliou os efeitos de uma dieta com restrição calórica contendo óleo de oliva extra virgem (EVOO) ou óleo de soja na

composição corporal e em parâmetros metabólicos relacionados com a obesidade em 41 mulheres adultas com excesso de adiposidade corporal. As mulheres recebiam diariamente um café-da-manhã *high-fat* contendo 25ml de óleo de soja (grupo controle) ou EVOO durante nove semanas consecutivas e essa refeição diária era parte de uma dieta com restrição calórica, porém normolipídica (-2090 kJ e ~32% do VET de lipídios). Os autores observaram que o EVOO promoveu redução de gordura corporal e melhorou a pressão arterial quando comparado com o grupo controle, indicando que o EVOO é uma boa opção no tratamento da obesidade.

Óleo de coco

Um alto consumo de ácidos graxos saturados é, geralmente, associado com o desenvolvimento de desordens metabólicas como obesidade, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares dentre outras (ECKEL et al., 2014; SCHAEFER, 2002). No entanto, vem surgindo evidências que fontes de ácidos graxos saturados de cadeia média (AGSCM), como o óleo de coco, podem ser benéficas na prevenção e tratamento da obesidade e síndrome metabólica (CHAMMA et al., 2017; MUMME; STONEHOUSE, 2015; NAGAO; YANAGITA, 2010). Os efeitos benéficos dos AGSCM parecem estar envolvidos com a sua rápida oxidação uma vez que eles são rapidamente absorvidos e transportados via veia porta, atingindo o fígado, onde são metabolizados, fornecendo energia de forma imediata, reduzindo sua captação pelo tecido adiposo (BABAYAN, 1987). Os AGSCM são, também, associados ao aumento da saciedade e termogênese (BABA; BRACCO; HASHIM, 1987; FRIEDMAN et al., 1999; ST-ONGE; JONES, 2002; VALENTE et al., 2017), o que pode contribuir para redução do peso corporal.

O óleo de coco é uma importante fonte de AGSCM uma vez que contém elevadas quantidades deste tipo de ácido graxo com destaque para a presença de ácido láurico (12:0) contribuindo com 45 a 50% da sua composição (ASSUNÇÃO et al., 2009). O óleo de coco virgem, sem processos de refinamento, ainda contém elevada quantidade de compostos fenólicos antioxidantes como o ácido caféico, ácido ferúlico, ácido sirínico, catequinas e epigallocatequinas que podem atuar contribuindo com os efeitos atribuídos a este óleo (MARINA et al., 2009).

Como dito anteriormente, os AGSCM têm uma rápida oxidação uma vez que, devido a sua natureza de cadeia mais curta que os AGPI, têm de 6 a 12 carbonos, são rapidamente absorvidos via veia porta, alcançando o fígado onde sofrem β -oxidação sem necessitar de reesterificação nas células intestinais ou incorporação em quilomicrons e, ainda, não necessitam da enzima carnitina-aciltransferase para promover o seu transporte intramitocondrial, onde ocorre a β -oxidação, processos pelos quais os AGPI são submetidos para serem metabolizados (MUMME; STONEHOUSE, 2015). Todo esse processo que leva a rápida oxidação e geração de energia proveniente dos AGSCM contribui para que os mesmos não sejam incorporados em lipoproteínas, alterando a lipídemia e estando disponíveis para serem estocados no tecido adiposo, contribuindo, dessa forma, para a redução do peso corporal e do perfil lipídico (BABAYAN, 1987).

Adicionalmente, alguns autores sugerem que a ingestão de AGSCM proporciona maior saciedade e reduz a ingestão alimentar, embora estes dados ainda sejam controversos (POPPITT et al., 2010; STUBBS; HARBRON, 1996; VALENTE et al., 2017). O mecanismo sugerido para que os AGSCM promovam este efeito está relacionado com o aumento da oxidação lipídica, uma vez que um estudo com roedores mostrou que uma redução na oxidação hepática de ácidos graxos foi capaz de estimular a ingestão alimentar através da redução da produção de energia pelo fígado (FRIEDMAN et al., 1999).

Um estudo realizado em mulheres de 20 a 40 anos com obesidade abdominal (circunferência de cintura > 88cm) avaliou o efeito da suplementação dietética com óleo de soja ou óleo de coco em parâmetros bioquímicos e antropométricos. As participantes ingeriam 30 ml de óleo de soja (Grupo S) ou óleo de coco (Grupo C) durante o dia através da alimentação, durante 12 semanas. Além disso, estas foram orientadas a seguir uma dieta hipocalórica balanceada, prescrita por um nutricionista, e a praticar caminhadas de 50 minutos por dia. Após as 12 semanas, foi observado que o grupo que recebeu a suplementação com óleo de coco apresentou maior concentração plasmática de HDL-c e menor razão LDL:HDL. Os dois grupos apresentaram redução do índice de massa corporal (IMC), no entanto, somente o grupo suplementado com óleo de coco apresentou redução na circunferência de cintura. O grupo S ainda apresentou aumento no colesterol total, LDL-c e na razão LDL:HDL, além de redução nos níveis de HDL-c, alterações não encontradas no grupo C. Estes dados sugerem que uma suplementação com óleo de coco não causa dislipídemia e parece promover uma redução na obesidade abdominal (ASSUNÇÃO et al., 2009).

Kasai et al. (2002) mostraram, em seu estudo com humanos, que uma refeição com 5 a 10g de TCM promove maior termogênese induzida pela dieta quando comparada a refeições

ricas em TCL. Este estudo avaliou o efeito de uma refeição (café da manhã) contendo 10g de TCM (grupo 10M) ou uma mistura de 5g de TCM e 5g de TCL (5M5L) (TCL proveniente de uma mistura de óleo de soja e óleo de linhaça) ou, ainda, 10g de TCL (10L) no gasto energético no período pós-prandial através de calorimetria indireta que foi realizada antes da refeição e durante as 6 horas posteriores e observou que tanto o grupo que recebeu 5g de TCM quanto o que recebeu 10g apresentou um maior gasto energético neste período, sugerindo uma maior termogênese induzida pela dieta nesses grupos.

Um estudo recente de Chamma et al. (2017) avaliou o efeito de diferentes quantidades de triglicerídeos de cadeia média (TCM) na dieta na adiposidade corporal e no metabolismo lipídico no fígado de camundongos C57BL/6 machos adultos. Os animais foram divididos em 5 grupos de acordo com a dieta que receberam por 12 semanas: dieta controle (grupo C, com 10% da energia da dieta proveniente dos lipídios); dieta *high-fat* banha de porco (grupo HF, dieta isoenergética com 50% da energia proveniente dos lipídios com banha de porco); dieta *high-fat* com uma mistura de banha e TCM, com substituição gradual da banha por TCM: HF-TCM 25%, HF-TCM 75% e HF-TCM 100%. Os autores observaram que uma alta quantidade de TCM (grupo HF-TCM 100%) adicionada na dieta foi capaz de promover redução do acúmulo de gordura corporal e da resistência à insulina com aumento de marcadores de beta oxidação e biogênese mitocondrial, no entanto, proporcionou, também acúmulo de lipídios no fígado e alteração no metabolismo hepático de lipídios, indicando que altas doses de TCM podem ser prejudiciais a longo prazo.

Programação metabólica

Durante a gestação e a lactação é comum que mulheres busquem uma alimentação saudável, alterando o seu padrão alimentar, com a inclusão de alimentos que podem proporcionar bem-estar e qualidade nutricional. Dessa forma, alimentos funcionais são, muitas vezes, incluídos na dieta de gestantes e lactantes na tentativa de melhorar a alimentação e amenizar os efeitos indesejáveis comuns na gestação, como constipação intestinal, enjôos e ganho excessivo de peso (CHAMP; HOEBLER, 2009; CHOUDHARY; GROVER, 2012). Entretanto, é importante considerar que alterações no padrão nutricional, hormonal e ambiental (fatores de *imprinting*) em períodos críticos da vida (gestação e/ou

lactação), podem repercutir de forma negativa a longo prazo, principalmente quando estas modificações ocorrem somente de forma temporária.

O conceito de programação metabólica foi estabelecido por diferentes estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais que mostram uma forte associação entre a exposição a fatores de *imprinting* durante períodos críticos da vida com o surgimento de doenças na idade adulta, como a obesidade, diabetes mellitus tipo 2, doenças coronarianas e metabólicas decorrentes de alterações fisiológicas adaptativas do organismo. No entanto, os mecanismos pelos quais essas alterações ocorrem ainda não estão totalmente elucidados, porém estudos evidenciam que essas desordens têm origem nos períodos iniciais do desenvolvimento (BARKER, 2003; BREIER et al., 2001; DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008; MOURA; PASSOS, 2005).

A programação metabólica, ou plasticidade ontogenética, ocorre, então, por mudanças no padrão fisiológico/ambiental ocorridas em períodos críticos que podem trazer consequências na idade adulta, provocando alterações nos processos fisiológicos, podendo levar ao desenvolvimento de doenças (BARKER, 1995). Essas alterações funcionais e estruturais podem se tornar permanentes e, caso a modificação do padrão ambiental, nutricional ou hormonal perdure até a idade adulta, o indivíduo, possivelmente, estaria melhor adaptado, no entanto, se essas alterações se modificarem, este indivíduo deixaria de ter uma vantagem adaptativa e passaria a apresentar um perfil metabólico desfavorável, com alterações que podem se tornar deletérias ao organismo (DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008; MOURA; PASSOS, 2005).

Atualmente é bem aceito que os diferentes fatores de *imprinting* levam a modificações na atividade genômica e que, apesar de não alterar a sequência do DNA, podem produzir alterações fenotípicas estáveis e transgeracionais, sendo, então, considerado um fenômeno epigenético. As alterações epigenéticas, em particular, a metilação do DNA e acetilação/metilação das histonas, fornecem uma "memória" em resposta ao momento de grande plasticidade dos períodos críticos e são fundamentais para a geração de um fenótipo, e da estabilidade deste, ao longo da vida (PANCHENKO et al., 2015; PORTHA et al., 2014); além disso, os microRNAs (miRNAs) que agem a nível pós-transcricional, inibindo a tradução de RNAs mensageiros-alvo, promovem o silenciamento de determinado gene (KIM, 2005; SATO et al., 2011), resultando numa remodelação da estrutura e funcionalidade dos tecidos (LANGLEY-EVANS; MCMULLEN, 2010).

Nesse contexto, nosso grupo vem demonstrando que mudanças no padrão alimentar, hormonal ou ambiental, especificamente no período da lactação, causam alterações

endócrino-metabólicas permanentes na prole na vida adulta. Vários são os agentes capazes de atuar no processo de programação: 1. fatores nutricionais, tais como: restrição protéica materna (FAGUNDES et al., 2007; LISBOA et al., 2006, 2012; PASSOS; RAMOS; MOURA, 2000); desmame precoce (FRANCO et al., 2013; LIMA et al., 2011, 2013; NOBRE et al., 2012, YOUNES-RAPOZO et al., 2012), supernutrição da prole (CONCEIÇÃO et al., 2013a, 2013b) e utilização materna de linhaça (FIGUEIREDO et al., 2012; TROINA et al., 2012); 2. fatores hormonais: tais como hipoprolactinemia materna pelo uso da bromocriptina (BONOMO et al., 2005; CARVALHO et al., 2015; PEIXOTO-SILVA et al., 2014; YOUNES-RAPOZO et al., 2015), hiperleptinemia neonatal (FRAGA-MARQUES et al., 2010; TOSTE et al., 2006; TREVENZOLI; VALLE; MACHADO, 2007) e hipertireoidismo neonatal (MOURA et al., 2008); e 3. fatores ambientais, tais como: exposição à fumaça do cigarro (PINHEIRO et al., 2015; SANTOS-SILVA et al., 2012, 2013) e a nicotina isoladamente (OLIVEIRA et al., 2009, 2010, 2011; PINHEIRO et al., 2015; SANTOS-SILVA et al., 2010) apenas no período de amamentação.

Em modelos experimentais onde mães lactantes foram submetidas a tipos diferentes de restrição alimentar (DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008; DUTRA et al., 2003; PASSOS; RAMOS; MOURA, 2000; FAGUNDES et al., 2007; PASSOS et al., 2002, 2004; TEIXEIRA et al., 2002; VICENTE et al., 2004), a alterações no padrão alimentar com introdução de alimentos funcionais (TROINA et al., 2012), a exposição a hormônios (leptina ou tiroxina) (FRAGA-MARQUES et al., 2010; MOURA et al., 2008; TOSTE et al., 2006; TREVENZOLI; VALLE; MACHADO, 2007) ou a poluentes ambientais (nicotina ou tabaco) (OLIVEIRA et al., 2009, 2010, 2011; PINHEIRO et al., 2015; SANTOS-SILVA et al., 2010, 2012, 2013) observamos que a composição bioquímica e hormonal do leite materno foi alterada e que as proles apresentaram modificação de peso e composição corporal, bem como alterações nos níveis de alguns hormônios como leptina, hormônios tireoidianos, insulina, dentre outros. Dessa forma, fica estabelecido que alterações no padrão alimentar ou hormonal de mães lactantes com consequente alteração na composição do leite materno podem programar alterações endócrino-metabólicas permanentes na sua prole.

Uso de óleos em períodos críticos do desenvolvimento

Atualmente, a suplementação ou, até mesmo, a substituição de alguns tipos de óleos por outros considerados mais saudáveis têm sido uma prática muito comum, inclusive em períodos como a gestação e a lactação, considerados períodos críticos do desenvolvimento, nos quais, como dito anteriormente, pode ocorrer a programação da prole para o surgimento de alterações metabólicas e doenças a longo prazo (CHAMP; HOEBLER, 2009; CHOUDHARY; GROVER, 2012). Contudo, ainda são poucos os estudos que avaliam o impacto da suplementação de alguns tipos de óleos ou da alteração no padrão dos lipídios fornecidos através da dieta nestes períodos da vida, como fator de programação (BENATTI et al., 2014; BISPO et al., 2015; FERNANDES et al., 2012; GUARDA et al., 2014; MAGRI et al., 2015; MISAN, et al., 2015; OOSTING et al., 2010; SOUZA et al., 2010; VAN DE HEIJNING et al., 2017). Há alguns estudos, ainda, que utilizam alguns óleos com já conhecidas ações benéficas no período “*pós-imprinting*” com o objetivo de prevenir as alterações causadas por um modelo de programação metabólica (BRINGHENTI et al., 2011; HOU et al., 2012).

Bringhenti et al. (2011) demonstraram, em roedores, que a ingestão de dieta enriquecida com óleo de peixe desde o desmame até a vida adulta foi capaz de prevenir os efeitos da programação metabólica por dieta hipoprotéica durante a gestação e lactação, na qual as proles tem maior predisposição para se tornarem obesas, hipercolesterolêmicas e hiperglicêmicas, hipertensas e apresentarem esteatose hepática na vida adulta. Neste estudo, a dieta enriquecida com óleo de peixe preveniu o ganho de massa adiposa com menor tamanho de adipócitos, levando a um menor peso corporal final, reduziu o colesterol total e triglicérido sérico nos animais programados quando comparados ao grupo que recebeu dieta controle. A dieta enriquecida com óleo de peixe ainda evitou o dano da estrutura hepática com melhora na esteatose e na pressão arterial, sugerindo que este óleo tem efeitos benéficos na resposta a programação.

Em um estudo com ratos programados pela superalimentação, onde as ninhadas são reduzidas durante a lactação para apenas 3 filhotes (SL), enquanto o grupo controle permanece com ninhadas de 10 filhotes (NL), foi oferecido para o grupo NL, após o desmame, uma dieta com 14% de lipídios provenientes de óleo de soja (rica em AGPI n-6) (Grupo NL) ou uma dieta com 31% de lipídios provenientes de banha (rica em AGS) (Grupo NL-HF), enquanto o grupo SL recebeu estas mesmas dietas (Grupos SL e SL-HF,

respectivamente) ou, ainda, uma dieta com 14% das calorias provenientes de óleo de peixe (rica em AGPI n-3) (Grupo SL-FO) até a 16^a semana de vida. Foi observado que a dieta com alto teor de lipídios induziu um maior e mais precoce ganho de peso corporal, hiperfagia, intolerância à glicose e hiperlipidemia em ratos do grupo SL quando comparados aos animais do grupo NL e que a dieta com óleo de peixe promoveu uma proteção contra a intolerância à glicose e a exposição elevada de glicocorticóides no tecido adiposo retroperitoneal e no fígado nos animais programados. Esses resultados sugerem que a composição dos ácidos graxos da dieta no período pós desmame pode interagir com o padrão dietético do período neonatal e impactar nas alterações metabólicas da vida adulta (HOU et al., 2012).

Sobre estudos que avaliaram os efeitos da alteração do perfil de lipídios da dieta em períodos críticos da vida promovendo alterações na vida adulta, pode-se citar um estudo realizado por Oosting et al. (2010), com camundongos C57BL/6, no qual foi ofertada para as mães uma dieta rica em óleo de peixe, através da substituição de 20% dos lipídios da dieta por este óleo, ou uma dieta controle a partir do 2^o dia de vida da prole, e a prole foi mantida na mesma dieta do desmame, aos 21 dias de vida, até os 42 dias de vida. A partir deste dia, a prole foi mantida em uma dieta ocidental típica, com o mesmo percentual de gordura, porém rica em ácidos graxos saturados (banha) e colesterol até os 98 dias de vida. O óleo de peixe ofertado no início da vida proporcionou um menor acúmulo de gordura, além de um número reduzido de adipócitos hipertrofiados e melhor perfil lipídico e homeostase glicêmica na vida adulta destes animais em comparação aos animais do grupo com dieta controle.

Magri et al. (2015), em seu estudo, avaliaram os efeitos de dietas contendo gordura parcialmente hidrogenada, rica em ácidos graxos trans (Grupo TG), gordura interesterificada (Grupo IG) ou óleo de palma, rico em AGSCM (grupo PG) comparados a uma dieta controle (Grupo CG) durante a gestação e a lactação no padrão de adiposidade total e na morfologia do tecido adiposo na prole adulta de camundongos C57BL/6. Foi observado que, na vida adulta, aos 3 meses de idade, os grupos PG e IG apresentaram maior peso corporal que os grupos CG e TG, associado a um maior conteúdo de tecido adiposo inguinal e epididimal, respectivamente. Os grupos IG e TG apresentaram adipócitos maiores, enquanto o grupo PG apresentou aumento no número de adipócitos. Dessa forma, este estudo mostra que a ingestão materna de gordura interesterificada e de óleo de palma durante a gestação e a lactação predispõe a prole para o desenvolvimento de obesidade na vida adulta.

Fernandes et al. (2012) mostraram que dietas compostas por óleo de soja, óleo de oliva, óleo de peixe ou óleo de linhaça durante os 12 primeiros dias de gestação podem alterar o perfil de ácidos graxos no tecido adiposo das mães e no colostro, onde estes seguem o perfil

de ácidos graxos presentes na dieta a qual as mães foram submetidas. Este perfil ainda é refletido na concentração plasmática de ácidos graxos da prole no momento do desmame. Estes resultados sugerem que o aumento da ingestão de alguns ácidos graxos durante o período inicial da gestação pode modular o metabolismo lipídico e alterar a composição do leite, alterando, ainda, o perfil de ácidos graxos do plasma da prole.

Recentemente, Van de Heijning et al. (2017) promoveram um estudo, em camundongos C57BL/6 e ratos Wistar, para avaliar se uma ingestão aumentada de AGSCM no início da vida afetaria positivamente a composição corporal e o perfil metabólico dos animais na vida adulta após a mudança para uma dieta estilo ocidental (WSD). Neste estudo, os animais eram divididos em 2 grupos: grupo controle, alimentado com uma dieta com uma mistura de óleos vegetais com perfil de ácidos graxos similar a fórmula láctea infantil (rica em AGPI); e grupo TCM, que recebia uma dieta contendo uma mistura de óleos com, aproximadamente, 50% de triglicerídeos de cadeia média. As dietas eram ofertadas para as mães desde o PN2 até o desmame, em PN 21, e as proles de cada grupo continuaram a receber sua respectiva dieta até PN42, quando os animais passaram a receber, então, uma dieta estilo ocidental (mesma quantidade de lipídios, porém composição diferente, com maior quantidade de gordura saturada e colesterol) até PN98. Os autores observaram que os camundongos do grupo TCM apresentaram menor acúmulo de gordura após serem expostos a dieta WSD quando comparados ao grupo controle com redução do tamanho dos adipócitos e níveis reduzidos de triglicerídeos e de leptina no plasma. No entanto, em relação aos efeitos da exposição ao TCM em ratos, nenhum efeito significativo foi observado na composição corporal e no perfil metabólico, mostrando que os resultados com relação à ingestão de TCM no início da vida ainda parecem ser controversos, embora, em camundongos, esta exposição precoce pareça exercer um efeito protetor contra a obesidade na vida adulta.

1 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Através de uma busca na literatura, verificamos que somente alguns óleos, como o óleo de peixe, o óleo de soja, o óleo de palma dentre alguns outros, foram alvo de pesquisas sobre os efeitos em longo prazo da sua utilização em períodos críticos da vida como a gestação e a lactação. No entanto, devido à ampla utilização e recomendação, por parte de profissionais de saúde, de outros tipos de óleos nesta fase crítica do desenvolvimento, torna-se necessário aumentar o conhecimento e o número de estudos com foco em avaliar os efeitos de óleos comumente usados nos dias de hoje, como o óleo de coco e o óleo de oliva, nestas fases, uma vez que estes, a exemplo de outros óleos previamente estudados, poderiam, também, alterar não só parâmetros endócrino-metabólicos das mães e do leite materno como, parâmetros das proles a curto e longo prazo.

Dessa forma, dada a importância da compreensão dos efeitos endócrino-metabólicos dos diferentes tipos de óleos consumidos durante a lactação e a quantidade limitada de estudos sobre a suplementação de alguns tipos de óleos no metabolismo de lactantes e da sua prole a curto e longo prazo, o presente estudo pretende avaliar os efeitos da suplementação da dieta de mães lactantes com óleo de soja, óleo de oliva, óleo de peixe e óleo de coco nos seus parâmetros endócrino-metabólicos e de sua prole no fim da lactação e na vida adulta.

Nossa proposta é também avaliar se a exposição contínua, durante toda a vida, ao óleo de coco através do leite materno, no período da lactação e através da ração no período pós desmame até 180 dias (vida adulta) promove alguma alteração nos padrões endócrino-metabólicos da prole a longo prazo ou se ocorre a prevenção de alterações promovidas quando este óleo é oferecido somente durante o período crítico da lactação, avaliando dessa forma, a teoria da programação metabólica como um processo evolutivo, a qual se defende que se a modificação do padrão nutricional, ambiental ou hormonal se mantiver ao longo da vida, este indivíduo seria de fato melhor adaptado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da suplementação materna com óleo de soja, óleo de oliva, óleo de peixe ou óleo de coco durante o período de lactação sobre parâmetros endócrino-metabólicos das proles a curto e longo prazos. Avaliar, ainda, os efeitos da exposição contínua, durante toda a vida, à suplementação com óleo de coco sobre parâmetros endócrino-metabólicos da prole a longo prazo.

2.2 Objetivos específicos

Nas nutrizes, avaliar:

- a) consumo alimentar e peso corporal durante a lactação;
- b) composição bioquímica e hormonal do leite ao final da lactação: lactose, proteínas totais, colesterol, triglicerídeos; leptina e triiodotironina (T3);
- c) composição corporal (massa de gordura visceral, conteúdo corporal total de gordura e massa magra) ao final da lactação;
- d) glicemia e níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos e hepáticos ao final da lactação;
- e) concentração de leptina, insulina, corticosterona, hormônio tireotrófico (TSH) e hormônios tireoideanos- tiroxina (T4) e T3 - no plasma ao final da lactação;
- f) marcadores da ação dos hormônios tireoideanos ao final da lactação: expressão de RNAm de UCP-1 no tecido adiposo marrom (TAM), de desidase 1 (Dio1) no fígado e conteúdo de receptor do hormônio tireoideano do tipo β 1 (TR β -1) no fígado.

Nas proles, avaliar:

- a) peso corporal durante a lactação e até os 180 dias de vida;

- b) ingestão alimentar do desmame até os 180 dias de vida;
- c) composição corporal (massa de gordura visceral, conteúdo corporal total de gordura e massa magra) aos 21 e 180 dias de vida;
- d) glicemia e níveis de colesterol e triglicérides plasmáticos e hepáticos aos 21 e 180 dias de vida;
- e) concentração de leptina, insulina, corticosterona, TSH, T4 e T3 no plasma aos 21 e 180 dias;
- f) conteúdo de leptina no tecido adiposo branco (TAB) visceral aos 180 dias;
- g) marcadores da ação dos hormônios tireoideanos aos 21 e 180 dias de vida: expressão de RNAm de UCP-1 no TAM; Dio1 no fígado e Dio2 no TAM e conteúdo de TR β -1 no fígado;

3 MATERIAL E MÉTODOS

O desenho experimental utilizado neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Para Uso Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/001/2014), estando de acordo com a Lei no. 11.794 sancionada em 2008. Todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina do Departamento de Ciências Fisiológicas do IBRAG da UERJ.

Foram utilizadas ratas Wistar nulíparas de três meses de idade, mantidas em biotério com temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (7:00 - 19:00h) controlados. Essas ratas foram acasaladas na proporção de 2 fêmeas para 1 macho, recebendo livre acesso a água e a ração comercial padrão para roedores até o nascimento de suas proles. Ao nascimento, as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes machos por mãe, pois este número garante o maior potencial lactotrófico (PASSOS et al., 2000).

3.1 Modelo experimental de programação metabólica por suplementação materna com diferentes tipos de óleos (soja, oliva, peixe e coco) no período da lactação – Experimento 1

Ao nascimento, as ninhadas foram aleatoriamente, divididas em quatro grupos:

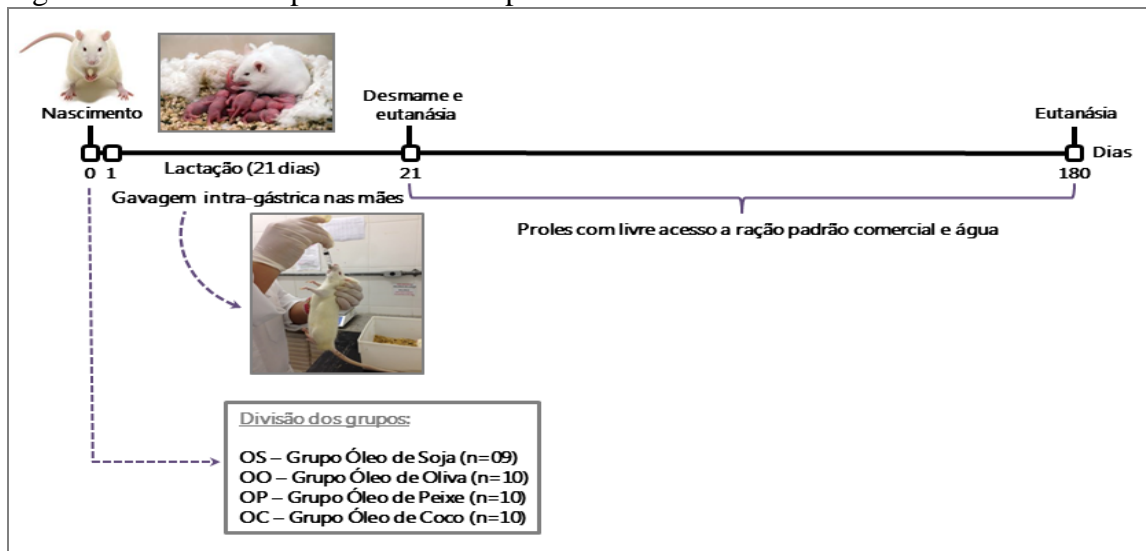
- a) **Grupo Óleo de Soja** (OS, n= 09 ninhadas): proles de mães que receberam óleo de soja (0,5g de óleo/kg de peso corporal), através de gavagem intragástrica, durante todo o período de lactação (21 dias);
- b) **Grupo Óleo de Oliva** (OO, n= 10 ninhadas): proles de mães que receberam óleo de oliva (0,5g de óleo/kg de peso corporal), através de gavagem intragástrica, durante todo o período de lactação;
- c) **Grupo Óleo de Peixe** (OP, n= 10 ninhadas): proles de mães que receberam óleo de peixe (0,5g de óleo/kg de peso corporal), através de gavagem intragástrica, durante todo o período de lactação;
- d) **Grupo Óleo de Coco** (OC, n= 15 ninhadas): proles de mães que receberam óleo de coco (0,5g de óleo/kg de peso corporal), através de gavagem intragástrica, durante todo o período de lactação.

Figura 1 - Gavagem intra-gástrica



Fonte: A autora, 2018.

Figura 2 - Desenho experimental do experimento 1



Fonte: A autora, 2018.

É importante ressaltar que o grupo óleo de soja foi utilizado como grupo controle por ser esta a fonte lipídica da dieta comercial padrão oferecida às mães, não alterando, assim, o perfil de ácidos graxos fornecido a este grupo. Além disso, uma vez que a quantidade de óleo oferecida foi bem pequena (menos de 200µl em cada gavagem) e aproximadamente a mesma para todos os grupos, não alterou a energia total diária da dieta.

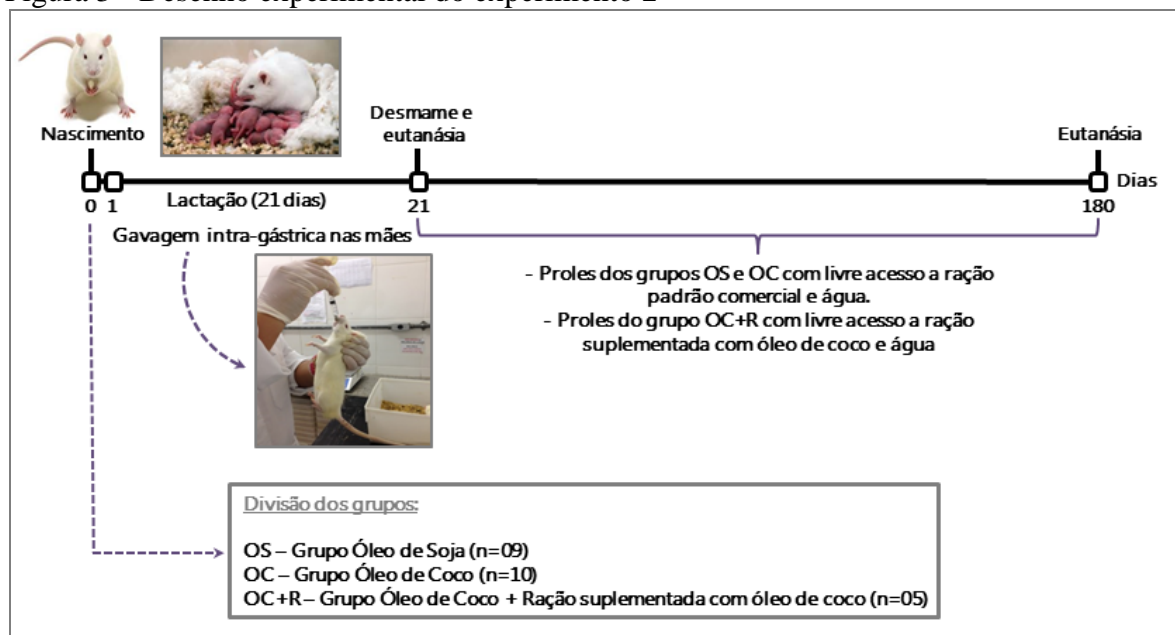
Após o desmame, todas as proles tiveram livre acesso a água e a ração comercial padrão.

3.2 Modelo de suplementação materna com óleo de coco (OC) no período da lactação, onde parte da prole continuou recebendo ração com óleo de coco ao longo da vida (OC+R) – Experimento 2

Neste experimento, foi utilizado parte dos animais do experimento 1, sendo subdividido aleatoriamente nos seguintes grupos:

- Grupo Óleo de Soja (OS, n= 09 ninhadas):** proles de mães que receberam óleo de soja (0,5g de óleo/kg de peso corporal), através de gavagem intra-gástrica, durante todo o período de lactação (21 dias);
- Grupo Óleo de Coco (OC, n= 10 ninhadas):** proles de mães que receberam óleo de coco (0,5g de óleo/kg de peso corporal), através de gavagem intra-gástrica, durante todo o período de lactação.
- Grupo Óleo de Coco + Ração suplementada com óleo de coco (OC+R, n= 05 ninhadas):** proles de mães que receberam óleo de coco (0,5g de óleo/kg de peso corporal), através de gavagem intra-gástrica, durante todo o período de lactação e, após o desmame, continuaram recebendo ração suplementada com óleo de coco durante toda a vida.

Figura 3 - Desenho experimental do experimento 2



Fonte: A autora, 2018.

3.3 Preparo da ração suplementada com óleo de coco

A ração padrão comercial foi triturada e foram adicionados proteína de soja texturizada, amido de milho e óleo de coco, de acordo com o quadro abaixo, a fim de equilibrar os macronutrientes sem alterar as fontes de proteínas (PTN) e carboidratos (CHO), mantendo a ração com características normocalórica, normoprotéica, normoglicídica e normolipídica.

Para o preparo dos novos *pellets*, foi adicionado um pouco de água e feita a homogeneização em batedeira por 10 minutos a fim de torná-la com uma consistência adequada para formação dos novos *pellets*, que, então, eram submetidos à secagem em estufa ventilada por 24 horas e, posteriormente, armazenados em geladeira. Esta ração era feita semanalmente para garantir a sua qualidade e validade.

Quadro 1 - Composição de macronutrientes da ração suplementada com óleo de coco

	QTD	CHO	PTN	LIP
Ração padrão* (g)	500	330	110	20
Amido (g)	600	510	0	0
Soja texturizada (g)	500	100	260	5
Óleo de coco (mL)	50	0	0	50
TOTAL	1650	940	370	75
TOTAL em 1000g		570	224	45
Kcal em 1000g	3585	2279	897	409
%Kcal		63,6	25,0	11,4
Mix de minerais** (g)	9,6	----	----	----
Mix de vitaminas** (g)	1,6	----	----	----
L-cistina (mg)	875	----	----	----
Metionina (mg)	150	----	----	----
Lisina (mg)	50	----	----	----
Butil-hidroxitolueno (BHT) (mg)	300	----	----	----

Legenda: *Ração padrão para ratos (%Kcal: CHO: 68%; PTN: 22,7%; LIP: 9,2%) (Nuvilab-NUVITAL Nutrientes LTDA, Paraná, Brasil).

**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 PG et al, 1993).

Fonte: A autora, 2018.

3.4 Eutanásia

Aos 21 dias de vida, as proles foram desmamadas e foi realizada a eutanásia das mães e de 2 filhotes de cada ninhada após jejum de 12 e 2 horas, respectivamente. Os 4 filhotes restantes de cada ninhada foram acompanhados até os 180 dias de vida, quando ocorreu a eutanásia após jejum de 12 horas. Os animais foram anestesiados com 55 mg/kg PC de quetamina e 100 mg/kg PC de xilazina e foi realizada remoção do sangue pela técnica de punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubo heparinizado K3 à vácuo, e centrifugado (1.260xg, 25 minutos, 4°C) para a obtenção do plasma que foi estocado em freezer à -20°C até as análises. Os tecidos separados para RT-PCR foram armazenados em tubos contendo RNAlater® e mantidos em freezer à -80°C, assim como os demais tecidos de interesse.

3.5. Avaliação do estado nutricional

Os seguintes parâmetros para avaliação do estado nutricional das proles foram utilizados:

- a) **Massa corporal:** durante os 21 dias da lactação, a massa corporal dos filhotes foi avaliada diariamente enquanto a massa das mães foi avaliada de 4 em 4 dias. Após o desmame, a aferição da massa corporal foi realizada de 4 em 4 dias até os 180 dias de idade.
- b) **Ingestão de ração:** a ingestão alimentar das mães durante o período de lactação e dos filhotes após o desmame até 180 dias de idade foi acompanhada de 4 em 4 dias. A quantidade de ração ingerida foi estimada pela diferença entre o peso da ração que restou na gaiola (Rf) e a quantidade total colocada 4 dias antes (Ri), de acordo com a fórmula:

$$\text{Ingestão de ração (g)} = \frac{(\text{Ri} - \text{Rf})}{4} \quad (1)$$

n

O “n” corresponde ao número de animais em cada gaiola, e “4” é o número de dias.

c) **Composição Corporal:**

- Quantificação do conteúdo corporal total de gordura e proteína –

Método de carcaça:

Aos 21 dias de vida, os filhotes e as mães tiveram sua composição corporal avaliada através da quantificação do conteúdo lipídico e protéico das carcaças determinada segundo método já padronizado em nosso laboratório (FAGUNDES et al., 2007; TOSTE et al., 2006).

Após sacrifício, todas as vísceras foram removidas. Em seguida as carcaças foram pesadas, amolecidas em autoclave por 1 h e homogeneizadas em água destilada na proporção 1:1. Separamos alíquotas contendo 3,0 g do homogeneizado para a determinação do conteúdo de gordura por método gravimétrico (STANSBIE et al., 1976). As alíquotas foram hidrolisadas em banho-maria a 70°C por 2 h na presença de KOH 30% e de etanol absoluto e, após acidificação com ácido sulfúrico 6 M, os ácidos graxos totais e o colesterol livre foram extraídos mediante 3 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, onde se procedeu à pesagem. Após a pesagem, as diluições foram corrigidas e os resultados expressos em gramas de gordura por 100 gramas de carcaça.

O conteúdo protéico foi determinado em alíquotas contendo 1,0 g do homogenato, que foram aquecidas a 37°C por 1 h em KOH 0,6 N, sob agitação. Após centrifugação (806 xg, 10 minutos), a concentração de proteínas totais foi determinada colorimetricamente no sobrenadante (PETERSON, 1977), utilizando-se curva padrão de albumina bovina. Os resultados foram expressos em gramas de proteína por 100 gramas de carcaça.

- Composição corporal através da absorciometria por dupla emissão de raios-x (DXA):

Aos 170 dias de vida, os ratos foram anestesiados com uma dose não letal (i.p.) do anestésico Avertin® e levados ao equipamento Lunar

DXA 200368 GE (Lunar, Wisconsin, EUA) com software específico (encore 2008. Versão 12,20 GE Healthcare, Wisconsin, EUA) (Figura 4). Com esta técnica foi possível avaliar individualmente: massa corporal total, massa magra total (g), gordura corporal total (g) e massa de gordura do tronco (%).

Figura 4 - Animais submetidos ao DXA



Nota: Utilizando um instrumento Lunar DXA 200368 GE (Lunar, Wisconsin, EUA).
Fonte: A autora, 2018.

- d) **Adiposidade central:** foi avaliada, aos 21 e 180 dias de vida, através do peso da gordura retroperitoneal, mesentérica e ovariana/epididimal as quais foram dissecadas e pesadas separadamente no dia da eutanásia. A soma desses compartimentos é denominada massa de gordura visceral (MGV) (HANSEN et al., 1997). Uma amostra de cada compartimento adiposo foi armazenada em freezer (-80°C) para análises posteriores.

3.6 Coleta do leite materno

No 20^o dia de lactação, as mães foram separadas de seus filhotes por 2 horas, anestesiadas com uma dose não letal de xilazina e quetamina e receberam uma injeção subcutânea de ocitocina (5UI). O leite foi coletado manualmente de todas as tetas após 15 minutos da injeção de ocitocina e armazenado a -20°C para análises posteriores.

3.7 Composição bioquímica do leite

A proteína total do leite foi dosada de acordo com o método de Peterson (1977), usando uma curva de albumina sérica bovina como padrão. A concentração de proteína foi determinada através da fórmula de Stauffer (1975) e os resultados foram expressos em mg/ml.

O conteúdo de colesterol e triglicerídeos foi medido em amostras de leite através de ensaio colorimétrico usando um kit comercial da Bioclin (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil). Para a análise de triglicerídeos, as amostras de leite foram diluídas em água destilada na proporção de 1:25). Os resultados de ambos foram expressos em mg/dl.

A lactose do leite foi analisada através de método colorimétrico usando ácido pícrico (Khramov, Kolomeitseva, Papichev, 2008), e, como curva padrão, lactose comercial (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA). Os resultados foram expressos em mg/ml.

As calorias totais do leite foram calculadas através da soma das calorias provenientes de cada macronutriente isolado.

3.8 Determinação de hormônios no leite

As concentrações de T3 e de leptina foram avaliadas no leite materno através de radioimunoensaio (RIE) e ensaio imunoenzimático (ELISA), respectivamente. O T3 total foi dosado através de RIE comercial (MP Biomedicals, LLC, Nova Iorque, EUA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4,4% e o limite de sensibilidade foi de 6,7 ng/dL. A leptina foi dosada através de kit comercial de ELISA (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 2,13% e o limite de sensibilidade foi de 0,08 ng/mL.

3.9 Dosagem da glicemia de jejum

A glicose sanguínea de mães e da prole aos 21 e 180 dias foi medida na veia caudal após jejum de 2 (prole de 21 dias) ou 12 horas (mães e prole 180 dias) através de glicosímetro (ACCU-CHEK Advantage; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha).

3.10 Dosagem de colesterol e triglicerídeos plasmáticos

Os níveis de colesterol total e triglicerídeos foram avaliados em amostras de plasma através de método colorimétrico utilizando um kit comercial da Bioclin (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil).

3.11 Dosagem de colesterol e triglicerídeos hepáticos

Amostras de 50 mg de fígado foram homogeneizadas em sonificador com 1 ml de isopropanol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) e centrifugadas (5900 rpm, 10 minutos, 4°C). O total de triglicerídeos e colesterol foi mensurado no sobrenadante a partir de ensaio colorimétrico utilizando kit comercial da Bioclin (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante.

3.12 Determinação das concentrações plasmáticas hormonais

Amostras de plasma foram utilizadas para diferentes dosagens hormonais por RIE e ELISA. Cada hormônio foi analisado em ensaio único, dispensando a avaliação do coeficiente de variação interensaio.

As concentrações de T4 livre e T3 total foram determinadas através de RIE comercial (MP Biomedicals, LLC, Nova Iorque, EUA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 3,9% para T4 livre e 4,4% para T3 total. O limite de sensibilidade foi de 0,045 ng/dL para T4 livre e 6,7 ng/dL para T3 total.

A insulinemia foi avaliada utilizando kit de RIE comercial (MP Biomedicals, LLC, Nova Iorque, EUA). O coeficiente de variação intraensaio foi de 4,3% e a sensibilidade limite de 4,6 μ UI/mL. Os valores foram expressos em μ UI/mL.

A corticosteronemia foi determinada através de RIE comercial (MP Biomedicals, LLC, Nova Iorque, EUA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 7,1% e sensibilidade de 7,7 ng/mL. Os valores foram expressos em ng/mL.

As concentrações plasmáticas de leptina foram determinadas através de ELISA (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) assim como os níveis plasmáticos de TSH (ALPCO Diagnostics, Salem, NH, EUA). O coeficiente de variação intraensaio foi de 2,13% para leptina e 3,7% para o TSH. O limite mínimo de sensibilidade para leptina foi de 0,08 ng/mL e de 0,01 ng/mL para o TSH. Os valores foram expressos em ng/mL.

3.13 Índice de Resistência à Insulina (IRI)

Foi feito o cálculo do índice de resistência à insulina (IRI) através da fórmula:

$$\text{IRI: insulina de jejum } (\mu\text{UI/ml}) \times \text{glicemia de jejum (mmol/l)} \quad (2)$$

3.14 Determinação dos níveis de leptina no tecido adiposo branco retroperitoneal

Os níveis de leptina foram analisados no tecido adiposo retroperitoneal através de ELISA (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) em ensaio único, dispensando o coeficiente de variação interensaio. O coeficiente de variação intra-ensaio foi 2,13% e o limite de sensibilidade foi de 0,08 ng/mL.

Antes do ensaio, as amostras de tecido adiposo foram homogeneizadas com tampão RIPA (50mM TRIS, 150mM NaCl, 0,1% SDS, 50mM NaF, 1mM ortovanadato de sódio, 30mM pirofosfato de sódio, 5mM-EDTA, Triton X-100 1%), adicionado de coquetel de inibidores de proteases (cOmplete EDTA-free - Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). Os homogenatos foram centrifugados três vezes a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C e o infranadante foi coletado e estocado a -20°C até serem utilizados na análise. A concentração de proteínas totais dos homogenatos foi dosada através de kit de dosagem de proteínas do ácido bicinonínico (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) e o resultado do ELISA foi corrigido pelo conteúdo de proteínas totais da respectiva amostra.

3.15 Análise da expressão de proteínas por Western Blotting

Foi avaliado o conteúdo de TR β 1 no fígado das mães e das proles de 21 e 180 dias e de UCP-1 no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes de 21 dias.

3.15.1 Processamento dos tecidos

O fígado e o TAM foram homogeneizados em tampão RIPA a 4°C (50mM TRIS, 150mM NaCl, 0,1% SDS, 50mM NaF, 1mM ortovanadato de sódio, 30mM pirofosfato de sódio, 5mM-EDTA, Triton X-100 1%), adicionado de coquetel de inibidores de proteases (cOmplete EDTA-free - Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). Os homogenatos de fígado foram centrifugados a 13200 rpm por 25 minutos a 4°C e os de TAM foram centrifugados três vezes seguidas a 13000 rpm por 5 minutos, a 4°C.

Os homogenatos foram utilizados para dosagem de proteína através do kit de dosagem de proteínas do ácido bicinconínico (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) e, em seguida, foi realizada a leitura em leitor de microplaca (TU-1800 UV-VIS, EUA) com comprimento de onda de 545-590nm.

Todos os homogenatos foram mantidos a -20 °C até serem utilizados nas análises de western blotting.

3.15.2 Western Blotting

Preparamos um gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e pipetamos, por *slot* do gel, 30 μ g de proteínas totais para as amostras de TAM e 10 μ g de proteínas totais para as amostras de fígado. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Hybond P, Amersham Biosciences, Inglaterra). Para inibir as ligações inespecíficas do anticorpo, cada membrana foi incubada por 45 minutos em 25mL de T-TBS acrescido de 1,25g de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) a 25°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas (*overnight*) com anticorpo

primário específico para cada proteína. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o anticorpo secundário, de acordo com o anticorpo primário utilizado (Quadro 2), por 1h (25°C) sob agitação constante. Após mais uma seqüência de lavagens, as membranas foram incubadas com estreptavidina com a mesma concentração do anticorpo secundário por 1h, 25°C. As membranas foram lavadas novamente com T-TBS, tratadas com quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences, Inglaterra) por 2 minutos e reveladas. As imagens das bandas foram analisadas e quantificadas com auxílio do programa *Image J* (Media Cybernetics).

Todos os resultados obtidos foram normalizados pela actina.

Quadro 2 - Anticorpos primários e secundários utilizados e suas respectivas diluições:

FÍGADO (MÃES)			
	Anticorpo primário	Anticorpo secundário biotilado	Estreptavidina com peroxidase (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA)
TRβ1	Anti-TRβ1 – Rabbit (Abcam Inc. Cambridge, MA, EUA) (1:500)	Anti-Rabbit (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:10000)	1:10000
ACTINA	Anti-Actina – Mouse (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:500)	Anti-Mouse (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:5000)	1:5000
FÍGADO (21 DIAS)			
TRβ1	Anti-TRβ1 – Rabbit (Abcam Inc. Cambridge, MA, EUA) (1:500)	Anti-Rabbit (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:10000)	1:10000
ACTINA	Anti-Actina – Mouse (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:500)	Anti-Mouse (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:10000)	1:10000
FÍGADO (180 DIAS)			
TRβ1	Anti-TRβ1 – Rabbit (Abcam Inc. Cambridge, MA, EUA) (1:500)	Anti-Rabbit (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:10000)	1:10000
ACTINA	Anti-Actina – Mouse (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:500)	Anti-Mouse (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:5000)	1:5000
TAM (21 DIAS)			
UCP-1	Anti-UCP-1 – Rabbit (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:500)	Anti-Rabbit (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:7000)	1:7000
ACTINA	Anti- Actina – Mouse (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:500)	Anti-Mouse (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (1:7000)	1:7000

Fonte: A autora, 2018.

3.16 Análise de expressão gênica por RT-PCR

O RNA total foi extraído a partir do fígado e tecido adiposo marrom (TAM) de mães e da prole de 180 dias, sob condições livre de RNase, com o reagente TRIzol (Cat. No.15596 - 018) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para o fígado e com kit comercial específico para extração de RNA de tecido adiposo – RNeasy Lipid Tissue Mini Kit – (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) para o TAM e quantificadas através do NanoVue™Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Buckinghamshire). Foram utilizadas as amostras com razão de absorvância $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$. O cDNA foi preparado a partir do RNA total, utilizando Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) para RT-PCR (Cat. No. 1158862) e Oligo(dT)15Primer (Promega, Madison, WI, EUA).

Foram mensuradas as expressões de RNAm de UCP-1 (ID: Rn00562126_m1) no TAM e desidase 1 (Dio 1) (ID:Rn00572183_m1) no fígado de mães e proles de 180 dias, além de desidase 2 (Dio2) (ID: Rn00581867_m1) no TAM de proles de 180 dias usando o TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) No AmpErase® UNG (Catálogo #: 4324018) (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante, com o equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). Foi utilizado como controle interno o primer da β -actina (ID: Rn00667869_m1). Todos primers e sondas foram preparados pela Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata, e os resultados foram normalizados pelos níveis de expressão do RNAm da β -actina utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK, et al., 2001).

3.17. Análise estatística

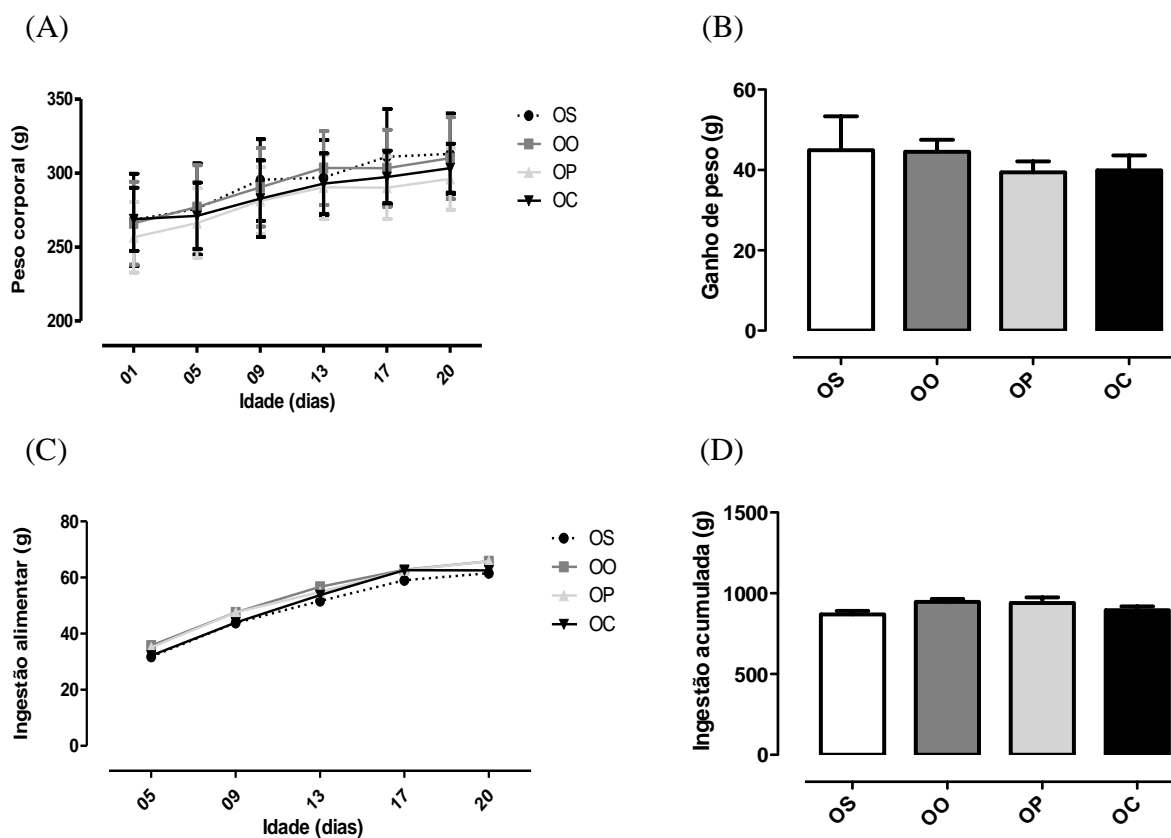
Os dados foram analisados por análise de variância univariada (One-way ANOVA), seguido do pós-teste Newman-Keuls. Todos os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram considerados significantes quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPadPrism 5.00 (San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Resultados das mães na lactação

Não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto ao peso corporal (Figura 5A), ganho de peso total (Figura 5B), ingestão alimentar (Figura 5C) e ingestão acumulada (Figura 5D) nas mães durante o período de lactação.

Figura 5 – Avaliação do peso corporal e ingestão alimentar de mães durante o período de lactação



Legenda: (A) Evolução do peso corporal; (B) ganho de peso; (C) evolução da ingestão alimentar; (D) ingestão acumulada; OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco

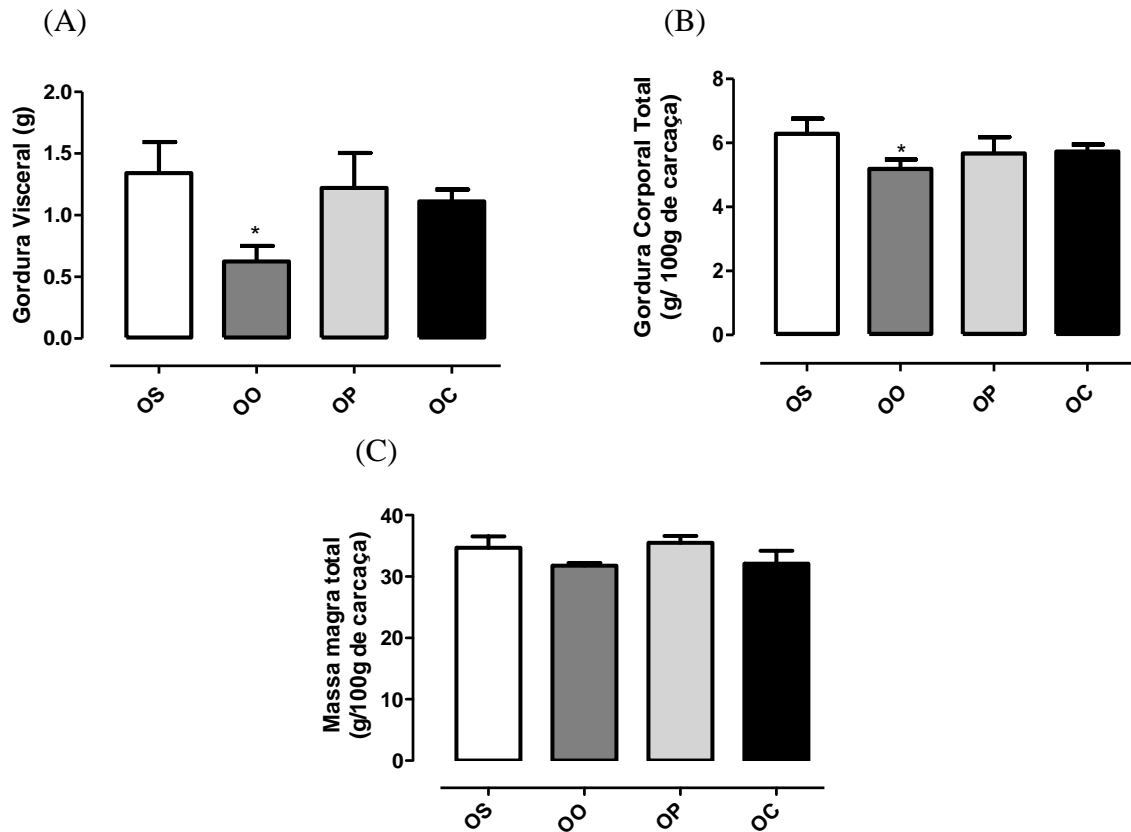
Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=10 por grupo, com exceção do grupo OS com n=09.

Fonte: A autora, 2018.

Ao final da lactação, as mães do grupo OO apresentaram menor conteúdo de gordura visceral (-53%, Figura 6A) e gordura total (-18%, Figura 6B) quando comparado ao grupo OS

e nenhuma diferença foi encontrada no conteúdo de massa magra total entre os grupos (Figura 6C).

Figura 6 – Composição corporal de mães ao final do período de lactação



Legenda: (A) Conteúdo de gordura visceral; (B) gordura corporal total, (C) massa magra total; OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; *Vs OS; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=10 por grupo, com exceção do grupo OS com n=09.

Fonte: A autora, 2018.

Com relação ao perfil bioquímico e hormonal, as mães dos grupos OO, OP e OC apresentaram, ao desmame, níveis elevados de colesterol plasmático quando comparados ao grupo OS (+32%, +28% e +35%, respectivamente, Tabela 1) e somente o grupo OO apresentou níveis plasmáticos elevados de triglicérides em comparação ao grupo OS (+72%, Tabela 1). Com relação aos níveis de glicose sanguínea, as mães do grupo OC apresentaram níveis mais baixos quando comparadas às mães dos grupos OS (-9%), OO (-12%) e OP (-9%), mas nenhuma diferença foi encontrada nos níveis de insulina plasmática e no índice de resistência à insulina entre os 4 grupos (Tabela 1). Além disso, não foram encontradas diferenças no conteúdo de colesterol e triglicérides hepáticos, bem como nos níveis plasmáticos de corticosterona e leptina entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1 - Perfil bioquímico e hormonal de mães ao final da lactação

	OS	OO	OP	OC
Mães				
Glicose (mg/dl)	83,89 ± 1,39	87,10 ± 2,13	84,33 ± 2,03	76,44 ± 2,03 ^{**§}
Insulina (µIU/ml)	17,50 ± 2,42	17,00 ± 1,36	23,93 ± 3,52	27,36 ± 6,10
Índice de resistência à insulina (IRI)	82,52 ± 12,80	91,32 ± 10,84	110,90 ± 19,28	123,3 ± 30,99
Colesterol plasmático (mg/dl)	62,36 ± 2,48	82,55 ± 5,536 [*]	79,68 ± 3,44 [*]	83,95 ± 4,81 [*]
Triglicerídeo plasmático (mg/dl)	87,97 ± 6,02	141,0 ± 20,92 [*]	113,7 ± 20,24	126,7 ± 15,34
Corticosterona (ng/ml)	716,1 ± 113,9	1092,0 ± 153,1	984,5 ± 92,37	1026,0 ± 146,2
Colesterol hepático ((mg/dl)/mg)	1,70 ± 0,17	1,67 ± 0,16	1,75 ± 0,15	1,49 ± 0,07
Triglicerídeo hepático ((mg/dl)/mg)	1,58 ± 0,19	1,54 ± 0,15	1,70 ± 0,15	1,80 ± 0,22
Leptina (ng/ml)	0,3174 ± 0,07	0,4401 ± 0,08	0,7406 ± 0,21	0,5601 ± 0,076

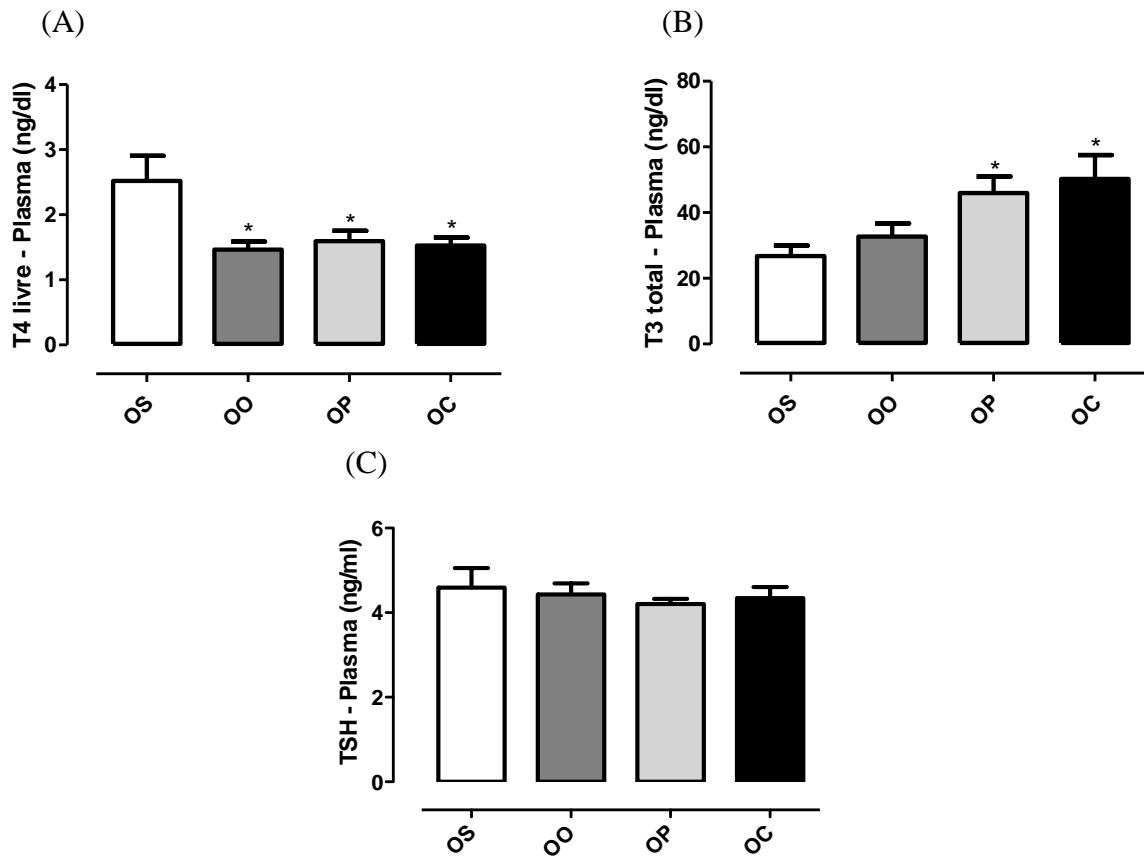
Legenda: OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco. ^{*}Vs OS; [§]Vs OO; [°]Vs OP; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média ± EPM; n=10 por grupo, com exceção do grupo OS com n=09.

Fonte: A autora, 2018.

Os grupos OO, OP e OC apresentaram níveis plasmáticos mais baixos de T4 livre (-42%; -37%; -39%, respectivamente, Figura 7A), enquanto somente os grupos OP e OC apresentaram níveis plasmáticos aumentados de T3 total quando comparados ao grupo OS (+72%; +88%, respectivamente, Figura 7B) e nenhuma diferença foi encontrada nos níveis plasmáticos de TSH.

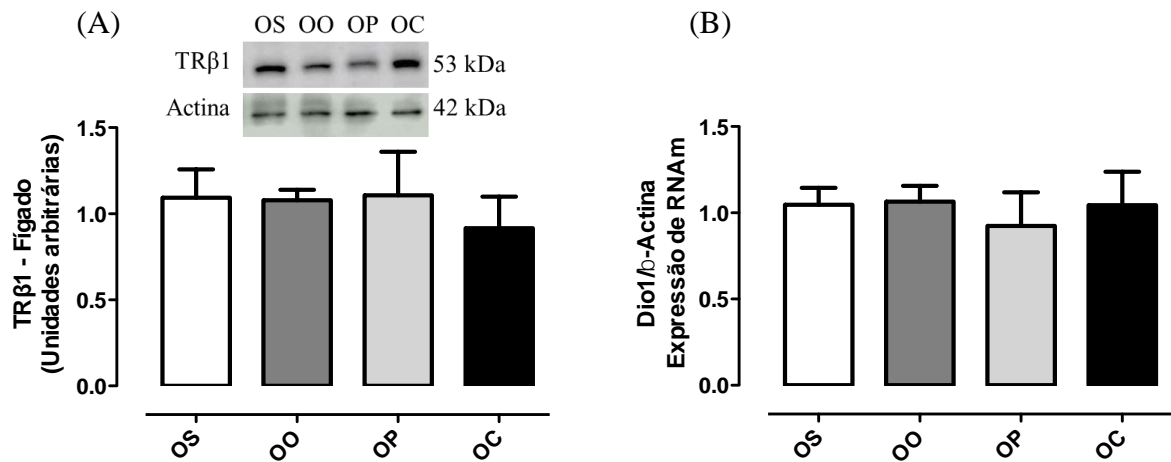
Figura 7 - Concentrações plasmáticas de hormônios relacionados a função tireoideana de mães ao final do período de lactação



Legenda: (A) Níveis plasmáticos de T4 livre; (B) níveis plasmáticos de T3 total (B); (C) níveis plasmáticos de TSH; OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; *Vs OS; $p < 0,05$.
 Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=10 por grupo, com exceção do grupo OS com n=09.
 Fonte: A autora, 2018.

Ao final da lactação, também foi analisado o conteúdo de TR β 1 e a expressão de RNAm de desidase 1 (Dio 1) no fígado das mães (Figura 8A e 8B, respectivamente) e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos para ambos os marcadores.

Figura 8 - Marcadores da função tireoideana no fígado de mães ao final do período de lactação



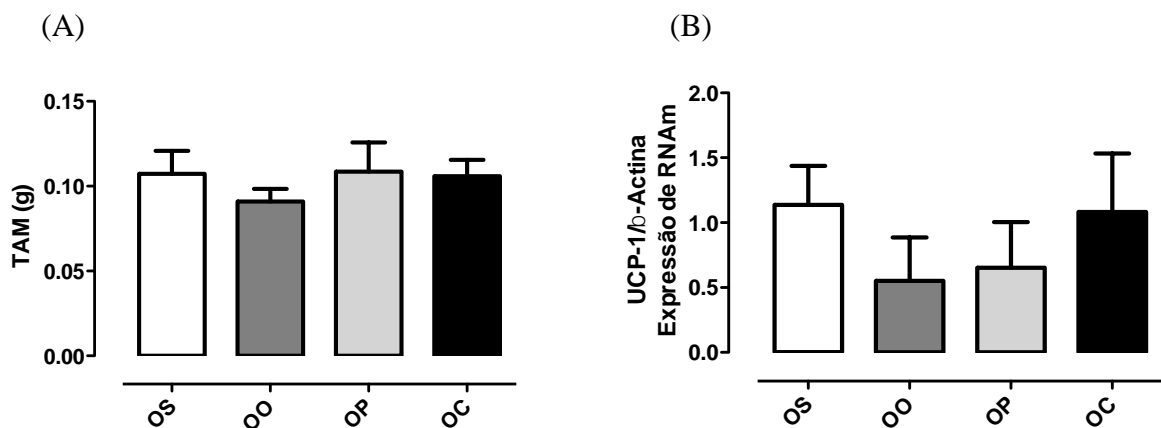
Legenda: (A) Conteúdo de TRβ1 com imagens das bandas representativas de cada grupo para a proteína de interesse e controle interno (actina); (B) expressão de RNAm de Dio 1; OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco.

Nota: Valores expressos em média ± EPM; n=07 para WB e n=09 para RT-PCR por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

Foram avaliados, ainda, o peso do TAM e a expressão de RNAm de UCP-1 neste tecido das mães e nenhuma diferença foi observada entre os grupos (Figura 9).

Figura 9 – Marcadores de termogênese em mães ao final do período de lactação



Legenda: (A) Peso do TAM; (B) expressão de RNAm de UCP-1; OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; *Vs OS; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média ± EPM; n=09 por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

A Tabela 2 mostra a composição bioquímica do leite materno ao final da lactação. Não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto ao conteúdo de lactose e proteína. Com relação ao perfil lipídico do leite, os grupos OO e OC apresentaram níveis aumentados de

colesterol em relação ao grupo OS (39% e +52%, respectivamente), enquanto somente o grupo OC apresentou maiores concentrações de triglicerídeos quando comparado aos outros três grupos (+94% Vs OS; +46% Vs OO; + 54% Vs OP). As mães dos grupos OO e OC apresentaram leite mais calórico quando comparados ao leite das mães do grupo OS (+40% e +78%, respectivamente). Os níveis de T3 e leptina no leite materno também foram avaliados e nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos para o T3, enquanto os níveis de leptina foram menores no leite das mães do grupo OC quando comparado aos outros três grupos (-45% Vs OS; -45% Vs OO; -47% Vs OP, Tabela 2).

Tabela 2 - Composição de macronutrientes e níveis de T3 e leptina no leite materno de mães ao final do período de lactação:

	OS	OO	OP	OC
Lactose (mg/ml)	36,84 ± 3,880	34,80 ± 3,654	37,94 ± 3,509	33,81 ± 2,775
Proteína total (mg/ml)	64,52 ± 5,837	74,11 ± 3,586	69,17 ± 3,473	71,11 ± 2,311
Colesterol (mg/dl)	367,0 ± 36,34	509,6 ± 32,67*	465,5 ± 48,38	558,7 ± 53,84*
Triglicerídeos (mg/dl)	3640 ± 405,9	4852 ± 406,5	4599 ± 686,5	7079 ± 780,0**§
Calorias totais (Cal/ml)	0,7060 ± 0,0697	0,9917 ± 0,0666*	0,9334 ± 0,1068	1,259 ± 0,1800*
T3 (ng/dl)	142,0 ± 16,08	184,3 ± 30,85	142,3 ± 12,86	183,7 ± 21,42
Leptina (ng/ml)	2,102 ± 0,116	2,128 ± 0,129	2,192 ± 0,137	1,166 ± 0,104**§

Legenda: OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; *Vs OS; §Vs OO; °Vs OP; $p < 0,05$.

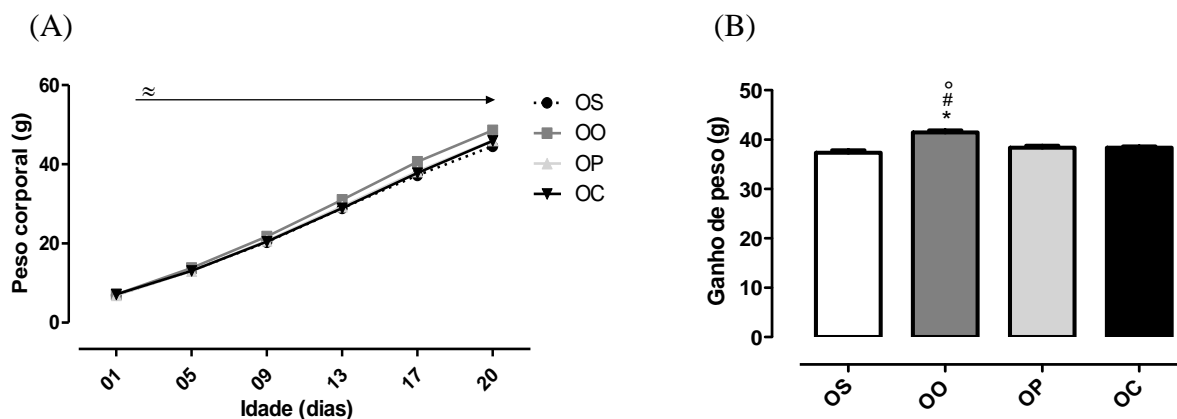
Nota: Valores expressos em média ± EPM; n=10 por grupo, com exceção do grupo OS com n=09.

Fonte: A autora, 2018.

4.2 Resultados das proles lactentes

Ao longo do período de lactação, foi observado que o grupo OO apresentou maior massa corporal que os outros três grupos desde o 3º dia de vida até o desmame (~8% Vs OS; ~6% Vs OP; ~6% Vs OC, Figura 10A), o que refletiu no seu ganho de peso total que se apresentou maior que o dos demais grupos (+10% Vs OS; +8% Vs OP; +8% Vs OC, Figura 10B).

Figura 10 - Avaliação do peso corporal das proles durante o período de lactação



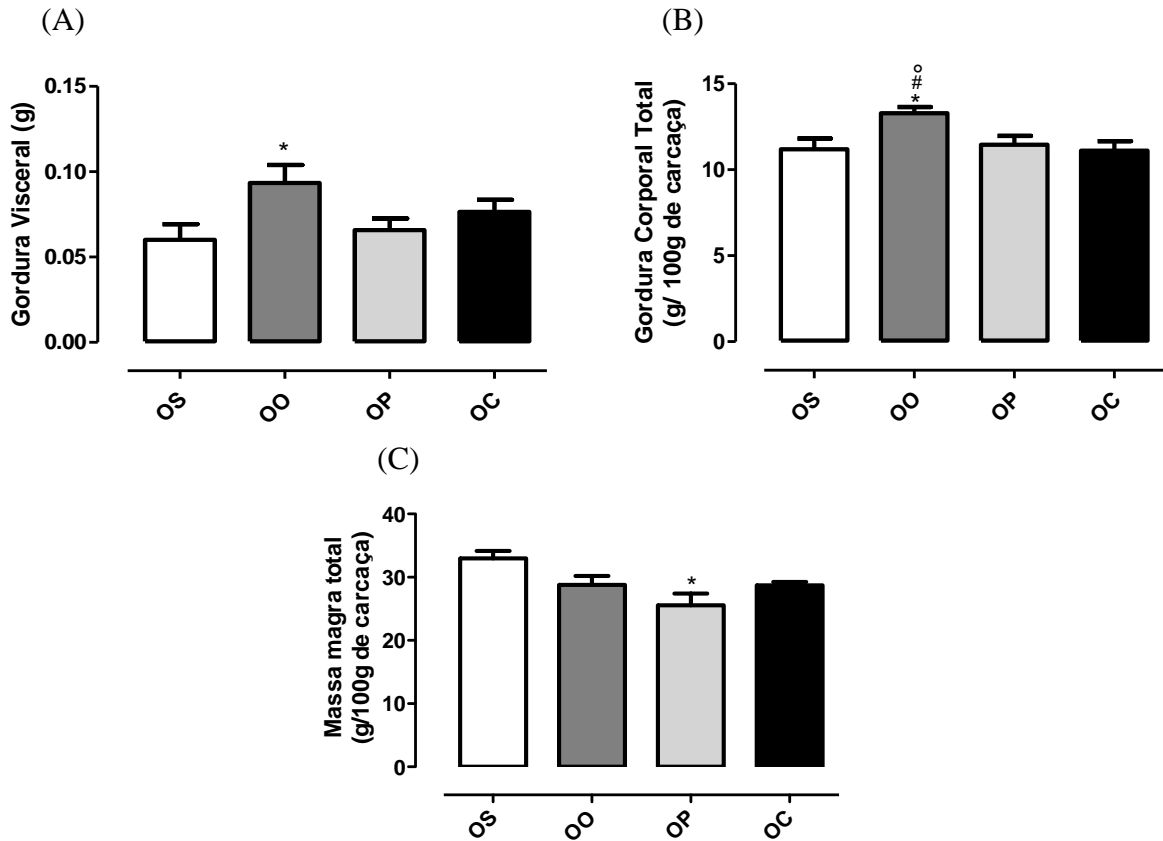
Legenda: (A) Evolução do peso corporal; (B) ganho de peso; OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco (OC); \approx OO Vs OS, OP, OC; *VsOS; # Vs OC; °Vs OP; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; $n=60$ por grupo, com exceção do grupo OS com $n=54$.

Fonte: A autora, 2018.

Ao desmame (21 dias de idade), foi observado que a prole do grupo OO apresentou maior conteúdo de gordura visceral quando comparado ao grupo OS (+56%, Figura 11A). Além disso, os filhotes do grupo OO apresentaram maior gordura corporal total quando comparado aos outros três grupos (+19% Vs OS; +16% Vs OP; +20% Vs OC, Figura 11B). Sobre a massa magra da prole aos 21 dias, o grupo OP apresentou menor conteúdo protéico em relação ao grupo OS (-22%, Figura 11C).

Figura 11 – Composição corporal das proles ao final do período de lactação



Legenda: (A) Conteúdo de gordura visceral; (B) conteúdo de gordura corporal total; (C) conteúdo de massa magra total (C); OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; *VsOS; # Vs OC; °Vs OP; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; $n=20$ por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

Quanto ao perfil bioquímico e hormonal da prole aos 21 dias, o grupo OP apresentou menores concentrações plasmáticas de colesterol total comparado ao grupo OO (-24%, Tabela 3). Menores concentrações plasmáticas de triglicérides foram observadas nos filhotes dos grupos OP e OC quando comparado as dos grupos OS e OO (-26% OP Vs OS; -29% OP Vs OO; -39% OC Vs OS; -41% OC Vs OO, Tabela 3). Não foram encontradas diferenças nas concentrações de colesterol e triglicérides hepáticos, glicose sanguínea, insulina, índice de resistência à insulina (IRI), corticosterona e leptina plasmáticas entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3 - Perfil bioquímico e hormonal das proles ao final do período de lactação:

	OS	OO	OP	OC
Filhotes (21 dias)				
Glicose (mg/dl)	96,11 ± 1,95	93,95 ± 2,63	96,90 ± 2,85	94,90 ± 2,60
Insulina (μIU/ml)	25,62 ± 3,39	18,58 ± 1,81	19,63 ± 1,92	17,82 ± 2,03
Índice de resistência à insulina (IRI)	135,0 ± 17,92	102,1 ± 14,21	108,2 ± 11,75	94,65 ± 10,81
Colesterol plasmático (mg/dl)	176,5 ± 12,84	199,6 ± 14,00	150,8 ± 11,05 [§]	169,0 ± 8,37
Triglicerídeo plasmático (mg/dl)	137,1 ± 10,42	140,8 ± 10,57	100,1 ± 12,41 ^{*§}	82,96 ± 8,71 ^{*§}
Corticosterona (ng/ml)	781,2 ± 84,46	828,6 ± 82,54	991,1 ± 61,98	786,4 ± 60,78
Colesterol hepático ((mg/dl)/mg)	1,40 ± 0,03	1,55 ± 0,08	1,65 ± 0,17	1,45 ± 0,06
Triglicerídeo hepático ((mg/dl)/mg)	1,65 ± 0,11	1,67 ± 0,08	1,70 ± 0,16	1,80 ± 0,11
Leptina (ng/ml)	1,21 ± 0,15	1,61 ± 0,20	1,29 ± 0,20	1,30 ± 0,19

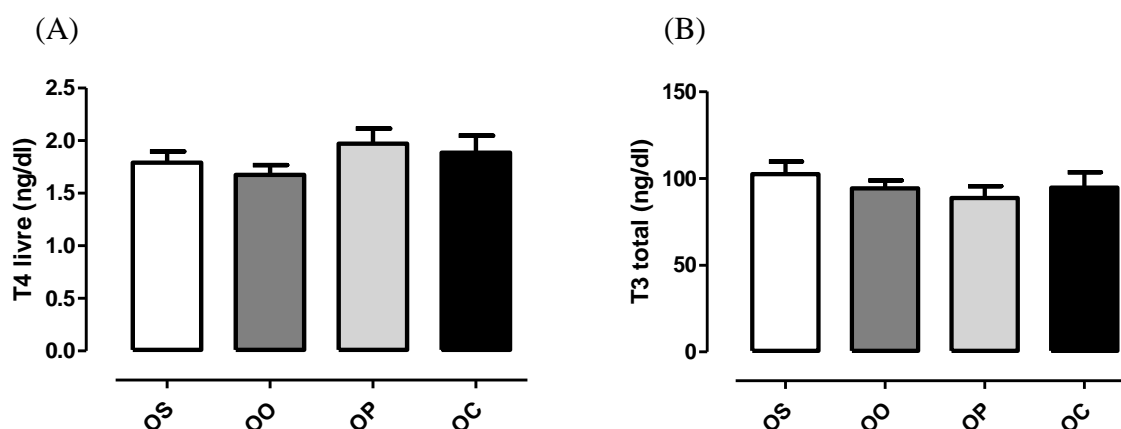
Legenda: OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; ^{*}Vs OS; [§]Vs OO; *p* < 0,05.

Nota: Valores expressos em média ± EPM; n=20 por grupo para análise de glicose e n=10 por grupo para as demais análises.

Fonte: A autora, 2018.

As concentrações plasmáticas de T4 livre e T3 total nas proles ao desmame não foram diferentes entre os grupos experimentais (Figura 12A e 12B, respectivamente).

Figura 12 - Concentrações plasmáticas de hormônios tireoideanos das proles ao final do período de lactação



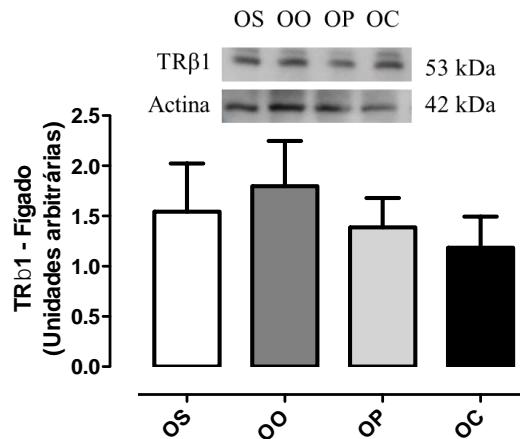
Legenda: (A) Níveis plasmáticos de T4 livre; (B) níveis plasmáticos de T3 total; OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco.

Nota: Valores expressos em média ± EPM; n=10 por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada no conteúdo de TR β 1 no fígado dos filhotes aos 21 dias de mães tratadas com os diferentes tipos de óleos (Figura 13).

Figura 13 - Conteúdo de TR β 1 no fígado das proles ao final do período de lactação



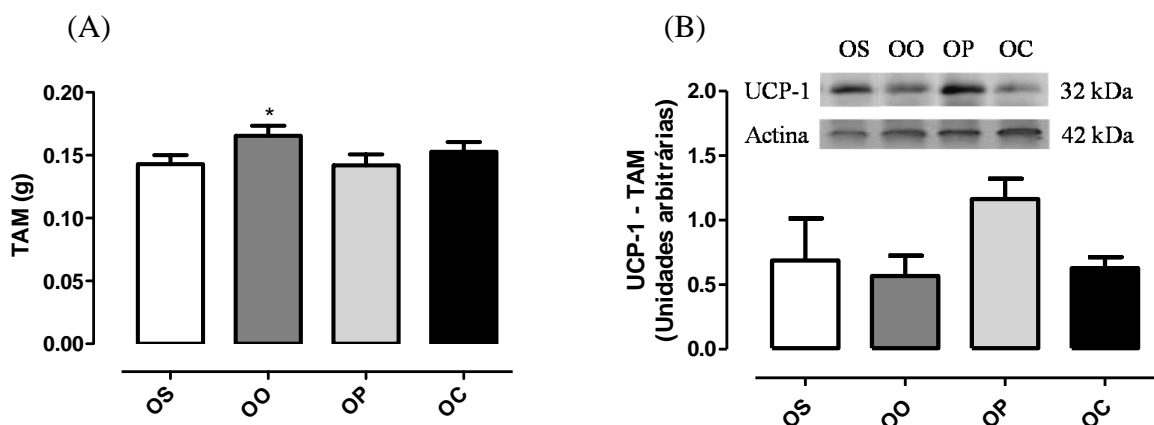
Legenda: Imagem das bandas representativas de cada grupo para a proteína de interesse e controle interno (actina); OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=07 por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

Foi observado que os filhotes do grupo OO apresentaram TAM mais pesado quando comparado ao grupo OS (+16%, Figura 14A), no entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada, entre os grupos, no conteúdo de UCP-1 neste tecido (Figura 14B).

Figura 14 - Marcadores de termogênese nas proles ao final do período de lactação



Legenda: (A) Peso do TAM; (B) conteúdo de UCP-1 com as imagens das bandas representativas de cada grupo para a proteína de interesse e controle interno (actina); OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; *Vs OS; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=20 por grupo para peso do TAM; n=07 por grupo para WB.

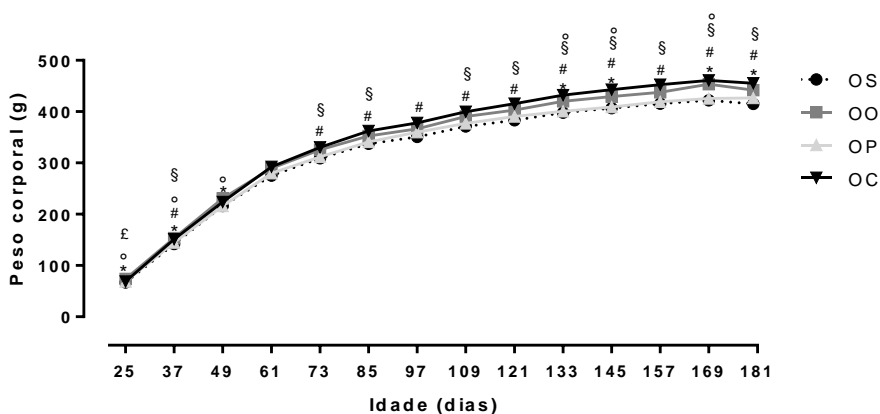
Fonte: A autora, 2018.

4.3 Resultados das proles adultas

4.3.1 Experimento 1 - proles adultas de mães tratadas com óleo de soja (OS), óleo de oliva (OO), óleo de peixe (OP) e óleo de coco (OC)

Na vida adulta, aos 180 dias de vida, os grupos OO e OC apresentaram maior peso corporal quando comparados ao grupo OS (+6% e 10%, respectivamente, Figura 15), além do grupo OC também apresentar maior peso corporal do que o grupo OP (+7%, Figura 15). Como mostra o gráfico de evolução de peso após o desmame e até os 180 dias de vida (Figura 15), o grupo OO já era mais pesado que o grupo OS desde o período do desmame (+10%), tendo normalizado o seu peso durante o decorrer da vida e voltando a ganhar peso a partir do dia 130 de vida (~+6%), mantendo este perfil até o dia 180. Já o grupo OC apresentou um aumento do peso corporal, em relação aos grupos OS e OP, a partir do 73º dia de vida (+7% Vs OS e +6% Vs OP) e manteve-se mais pesado até o dia do sacrifício (~+9% Vs OS e ~+7% Vs OP ao longo da vida).

Figura 15 - Evolução do peso corporal das proles a partir do desmame até os 180 dias de vida



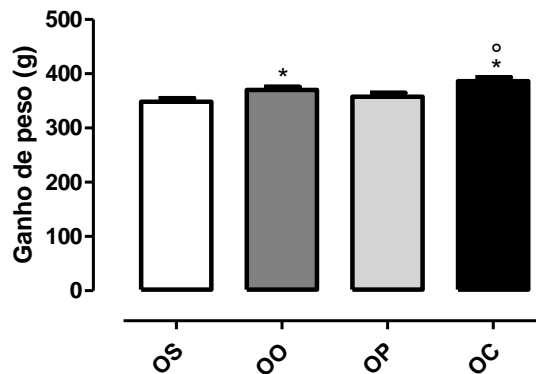
Legenda: OS: óleo de soja (OS); OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; *OO Vs OS; ° OO Vs OP; £ OO Vs OC; # OC Vs OS; \$ OC Vs OP; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; $n=40$ por grupo, com exceção do grupo OS com $n=36$.

Fonte: A autora, 2018.

Ao analisar o ganho total de massa corporal a partir do desmame até o fim da vida, o perfil apresentado no gráfico de evolução de peso foi mantido com o grupo OO apresentando maior ganho de peso do que o grupo OS (+6%) e o grupo OC apresentando maior ganho de peso total quando comparado aos grupos OS (+11%) e OP (+8%) (Figura 16).

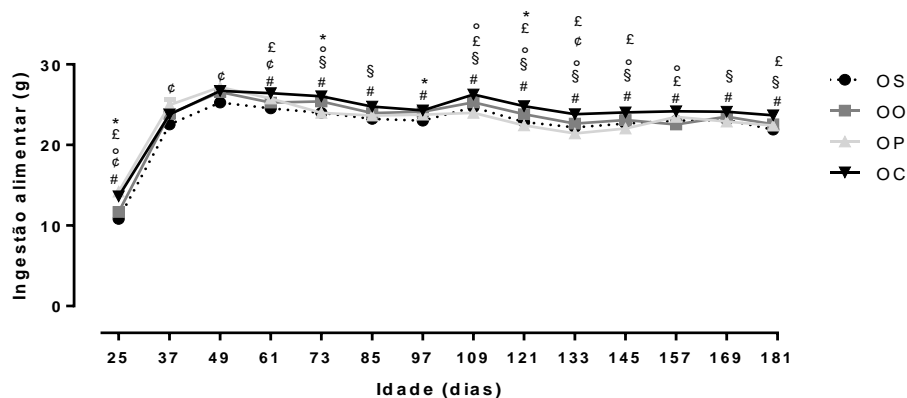
Figura 16 - Ganho de peso corporal total das proles a partir do desmame até os 180 dias de vida



Legenda: OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; * Vs OS; ^o Vs OP; $p < 0,05$.
 Nota: Valores expressos em média \pm EPM; $n=40$ por grupo, com exceção do grupo OS com $n=36$.
 Fonte: A autora, 2018.

Em relação à ingestão alimentar ao longo da vida (Figura 17), a alteração mais expressiva foi observada no grupo OC que se tornou hiperfágico quando comparado aos grupos OS, OO e OP a partir do dia 109 (+6% Vs OS; + 4% Vs OO; +9% Vs OP) até o dia 180 de vida (\sim +7% Vs OS; \sim +5% Vs OO; \sim + 9% Vs OP ao longo da vida), no entanto, em relação ao grupo OS, o grupo OC já apresentava-se hiperfágico desde o dia 61 (+8%). O grupo OP apresentou menor ingestão alimentar quando comparado ao grupo OO do dia 109 ao dia 145 (-5%), no entanto essa alteração não se manteve até o fim da vida (Figura 17).

Figura 17 – Evolução da ingestão alimentar das proles a partir do desmame até os 180 dias de vida.

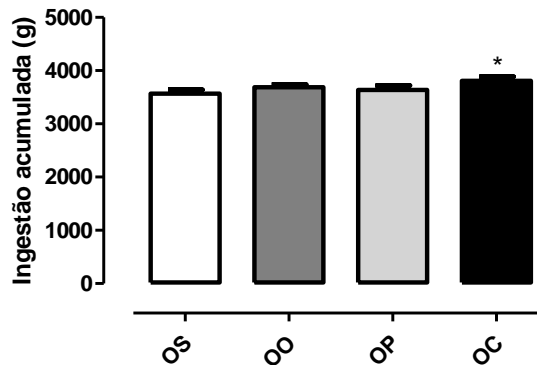


Legenda: OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; * OO Vs OS; ^o OO Vs OP; [±] OO Vs OC; # OC Vs OS; [¢] OP Vs OS; [§] OC Vs OP; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; $n=40$ por grupo, com exceção do grupo OS com $n=36$.
 Fonte: A autora, 2018.

Contudo, ao analisar a ingestão alimentar acumulada ao longo dos 180 dias de vida, somente o grupo OC apresentou uma maior ingestão alimentar quando comparado ao grupo OS (+7%, Figura 18).

Figura 18 - Ingestão alimentar acumulada das proles durante os 180 dias de vida



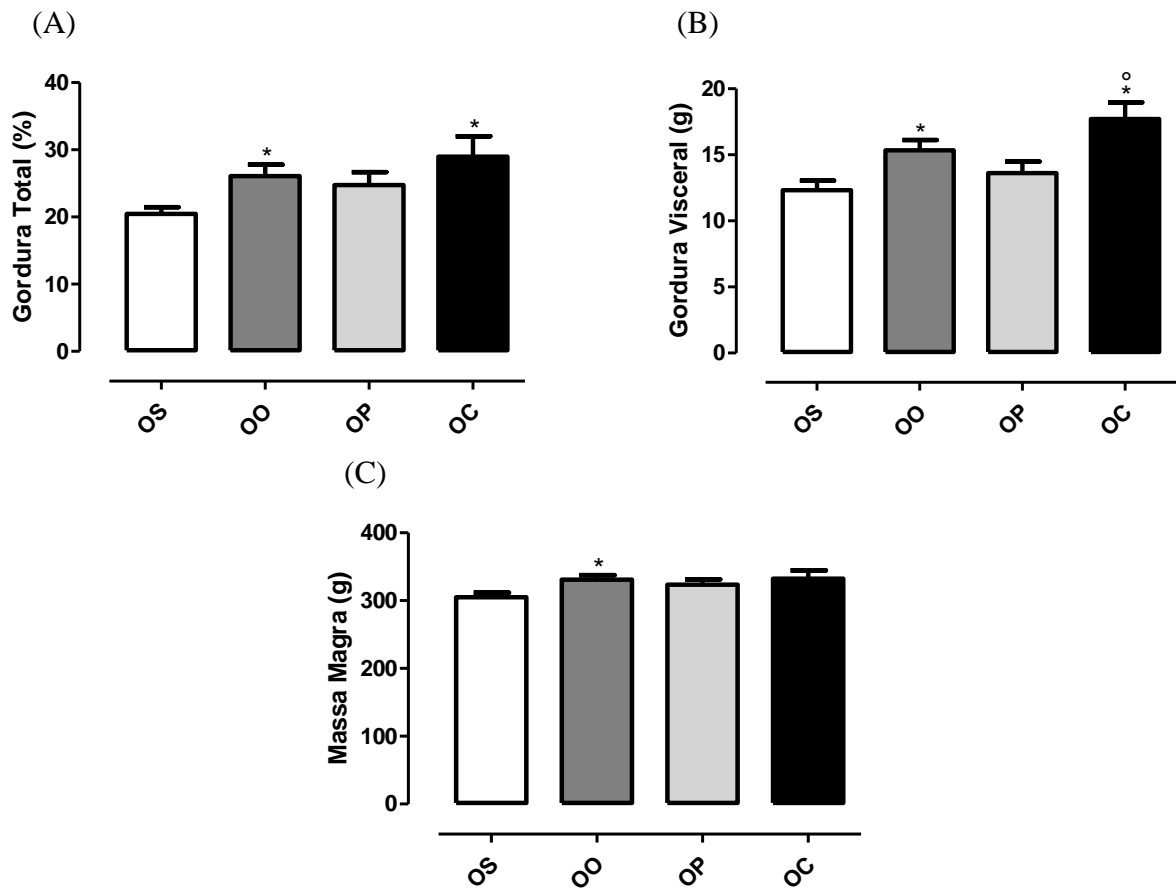
Legenda: OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; *Vs OS; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=40 por grupo, com exceção do grupo OS com n=36.

Fonte: A autora, 2018.

Em relação à composição corporal aos 180 dias de vida, foi observado que os grupos OO e OC apresentaram maior % de gordura total (+27% e +42%, respectivamente, Figura 19A) e conteúdo de gordura visceral (+24% e +44%, respectivamente, Figura 19B) comparados ao grupo OS. E, ainda, somente o grupo OC apresentou maior conteúdo de gordura visceral quando comparado ao grupo OP (+30%, Figura 19B). Em relação à massa magra, somente o grupo OO apresentou maior conteúdo em relação ao grupo OS (+9%, Figura 19C).

Figura 19 – Composição corporal das proles aos 180 dias de vida



Legenda: (A) Percentual de gordura corporal total; (B) conteúdo de gordura visceral, (C) conteúdo de massa magra total (C); OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; *Vs OS; °Vs OP; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=10 por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

Foi realizada a análise do perfil bioquímico e hormonal dos animais aos 180 dias de vida e nenhuma diferença significativa foi encontrada para os níveis de glicose sanguínea, insulina, índice de resistência à insulina (IRI), corticosterona e colesterol plasmáticos entre os grupos (Tabela 4). Sobre os triglicerídeos plasmáticos, o grupo OC apresentou níveis maiores em relação ao grupo OP (49%, Tabela 4). Também não houve diferença significativa no conteúdo de colesterol e triglicerídeos hepáticos entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 - Perfil bioquímico e hormonal das proles aos 180 dias de vida

	OS	OO	OP	OC
	180 dias			
Glicose (mg/dl)	89,92 ± 1,799	92,92 ± 1,337	92,53 ± 1,375	92,80 ± 1,117
Insulina (µIU/ml)	19,74 ± 2,777	21,70 ± 2,020	20,37 ± 2,392	21,73 ± 2,494
Índice de resistência à insulina (IRI) (µM)	98,66 ± 14,62	112,6 ± 11,35	96,43 ± 6,99	116,3 ± 15,56
Colesterol plasmático (mg/dl)	55,81 ± 5,700	50,82 ± 3,048	55,58 ± 3,577	55,41 ± 5,787
Triglicerídeo plasmático (mg/dl)	92,60 ± 14,19	79,89 ± 7,716	71,22 ± 7,623	106,3 ± 13,93 ^o
Corticosterona (ng/ml)	982,1 ± 148,0	1062 ± 135,7	901,7 ± 146,6	1094 ± 174,1
Colesterol hepático ((mg/dl)/mg)	1,84 ± 0,18	1,43 ± 0,06	1,53 ± 0,08	1,75 ± 0,23
Triglicerídeo hepático ((mg/dl)/mg)	1,96 ± 0,08	2,32 ± 0,13	2,15 ± 0,12	2,11 ± 0,14

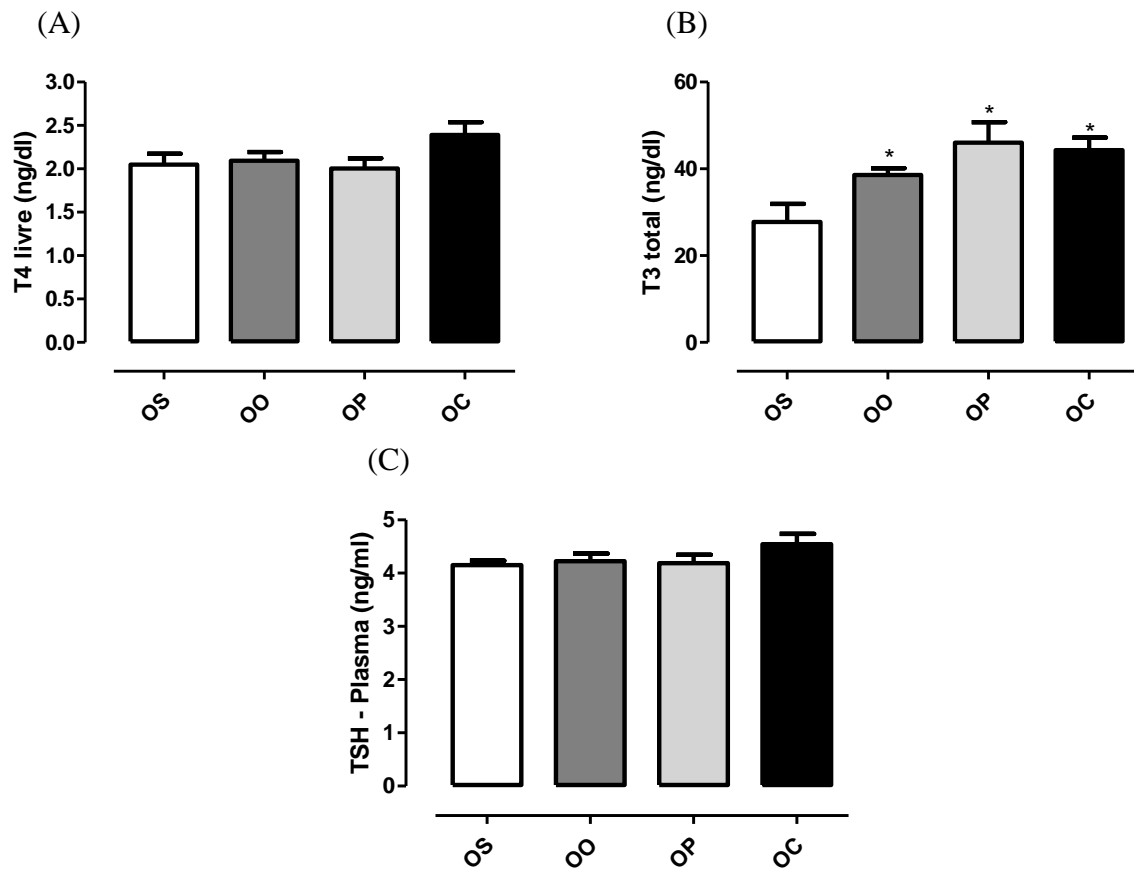
Legenda: OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; ^oVs OP; *p*<0,05.

Nota: Valores expressos em média ± EPM; n=40 por grupo para análise da glicose e n=10 para as demais análises.

Fonte: A autora, 2018.

Em relação aos hormônios tireoideanos, aos 180 dias, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de T4 livre entre os grupos (Figura 20A) e os níveis de T3 total apresentaram-se maiores nos grupos OO, OP e OC quando comparados ao grupo OS (+39%, +66% e +59%, respectivamente, Figura 20B). Contudo, nenhuma diferença foi observada nos níveis de TSH plasmático (Figura 20C).

Figura 20 - Perfil plasmático de hormônios relacionados a função tireoideana em proles aos 180 dias de vida.



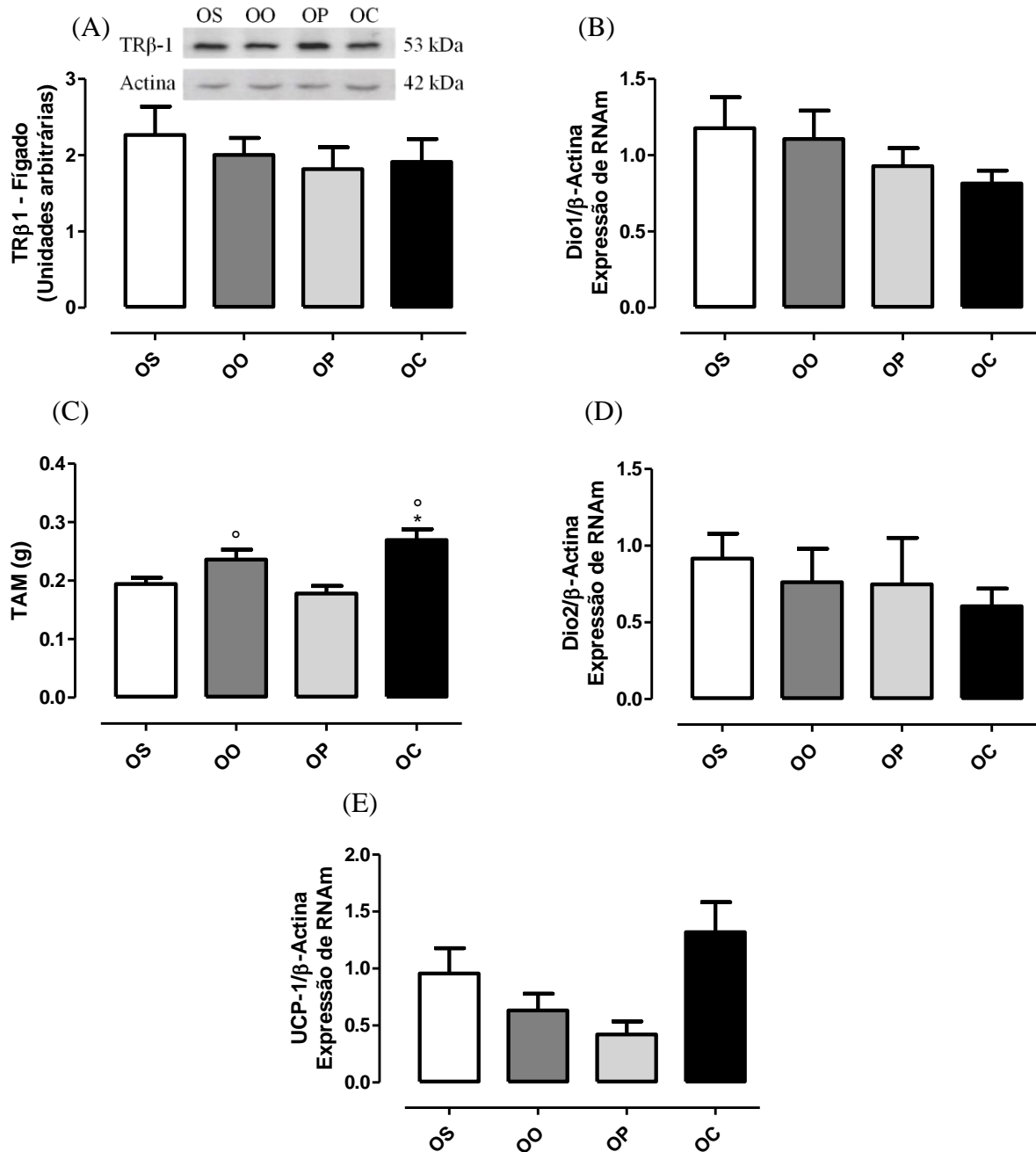
Legenda: (A) Níveis plasmáticos de T4 livre; (B) níveis plasmáticos de T3 total (B); (C) níveis plasmáticos de TSH; OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; *Vs OS; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=10 por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

Foram avaliados, ainda, marcadores da função tireoideana no fígado e no TAM, no entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada no conteúdo de TR β 1 no fígado (Figura 21A) e na expressão de RNAm de desidase 1 no fígado (Figura 21B) e desidase 2 e UCP-1 no TAM (Figura 21D e 21E, respectivamente), embora tenha sido observado que o TAM do grupo OC era mais pesado em relação ao TAM do grupo OS e OP (+39% e +51%, respectivamente) e o grupo OO apresentou este tecido mais pesado do que o do grupo OP (+21%, Figura 21C).

Figura 21 - Marcadores da função tireoideana no fígado e no TAM das proles aos 180 dias de vida



Legenda: (A) conteúdo de TRβ1 no fígado com imagens das bandas representativas de cada grupo para a proteína de interesse e controle interno (actina); (B) expressão de RNAm de desidase 1 (Dio1) no fígado; (C) peso do TAM; (D) expressão de RNAm de desidase 2 (Dio2) no TAM; (E) expressão de RNAm de UCP-1 no TAM; OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco (OC).

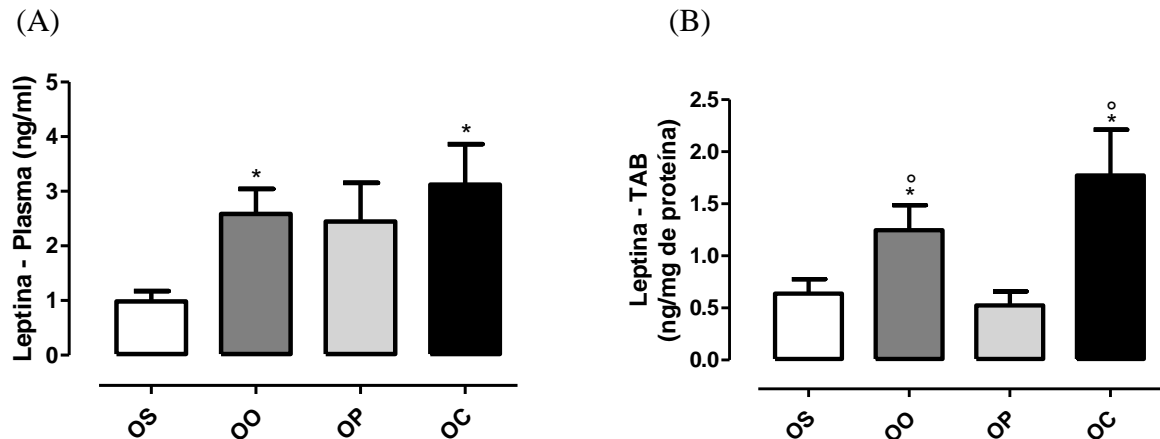
Nota: Valores expressos em média ± EPM; n= 07 por grupo para WB e n=09 por grupo para RT-PCR.

Fonte: A autora, 2018.

Foi observado, ainda, um aumento nas concentrações de leptina plasmática nos grupos OO e OC quando comparados ao grupo OS (+163% e +217%, respectivamente, Figura 22A)

e, ao analisar o conteúdo de leptina no tecido adiposo, foi observado o mesmo perfil de aumento de conteúdo do hormônio nos grupos OO e OC em relação ao grupo OS (+95% e +178%, Figura 22B) e que, neste tecido, também foi maior em relação ao grupo OP (1.4 e 2.4 *fold-increase*, respectivamente, Figura 22B).

Figura 22 - Níveis plasmáticos e conteúdo tecidual de leptina das proles aos 180 dias de vida.



Legenda: (A) Níveis plasmáticos de leptina; (B) conteúdo de leptina no tecido adiposo branco retroperitoneal; OS: óleo de soja; OO: óleo de oliva; OP: óleo de peixe; OC: óleo de coco; *Vs OS; ^oVs OP; $p < 0,05$.

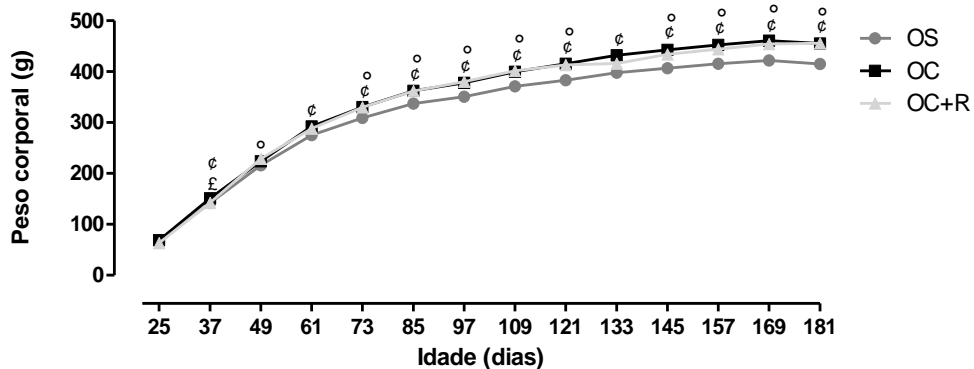
Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=10 por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

4.3.2 Experimento 2: proles adultas de mães tratadas com óleo de coco na lactação (OC) e que continuaram recebendo ração com óleo de coco ao longo da vida (OC+R)

Aos 180 dias de vida, os animais dos grupos OC e OC+R apresentaram maior peso corporal em relação ao grupo OS (+11% e +13%, respectivamente, Figura 23). O gráfico de evolução de peso desde o desmame até os 180 dias de vida (Figura 23) mostra que este perfil foi encontrado a partir do dia 73 (+7% para ambos os grupos) e se manteve até o fim da vida (~+8% para ambos os grupos ao longo da vida, Figura 23).

Figura 23 – Evolução do peso corporal das proles a partir do desmame até os 180 dias de vida.



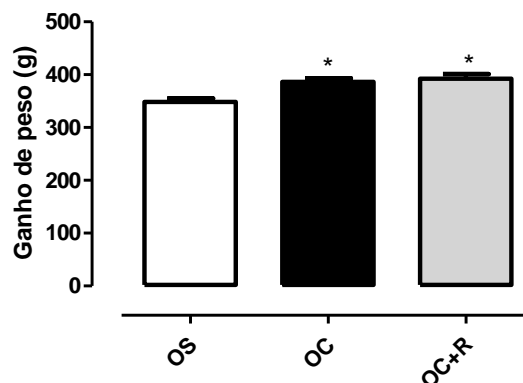
Legenda: OS: óleo de soja; OC: óleo de coco; OC+R: óleo de coco + ração suplementada com óleo de coco; ‡ OC Vs OC+R; § OC Vs OS; ° OC+R Vs OS; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; $n=36$ para grupo OS; $n=40$ para grupo OC; e $n= 24$ para grupo OC+R.

Fonte: A autora, 2018.

Ao se analisar o ganho de peso total a partir do desmame até o fim da vida, observou-se que o perfil apresentado no gráfico de evolução de peso foi mantido com os grupos OC e OC+R apresentando maior ganho de peso corporal total quando comparados ao grupo OS ao longo dos 180 dias de vida (+11% e +13%, respectivamente, Figura 24).

Figura 24 - Ganho de peso corporal total das proles a partir do desmame até os 180 dias de vida.



Legenda: OS: óleo de soja; OC: óleo de coco; OC+R: óleo de coco + ração suplementada com óleo de coco; *Vs OS; $p < 0,05$.

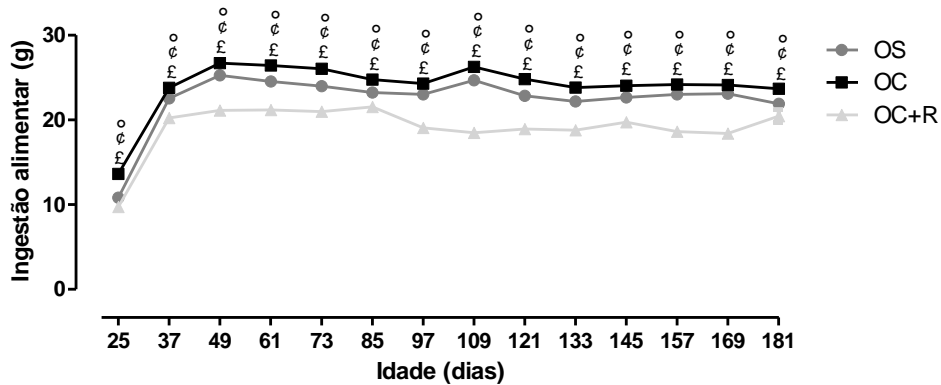
Nota: Valores expressos em média \pm EPM; $n=36$ para grupo OS; $n=40$ para grupo OC; e $n= 24$ para grupo OC+R.

Fonte: A autora, 2018.

Em relação à ingestão alimentar ao longo dos 180 dias de vida, pôde-se observar que desde o desmame o grupo OC apresentou um comportamento hiperfágico em relação ao grupo OS ($\sim +8\%$ ao longo da vida, Figura 25), enquanto o grupo OC+R apresentou

comportamento hipofágico quando comparado ao grupo OS (~15% ao longo da vida, Figura 25) e este quadro foi mantido até os 180 dias de vida.

Figura 25 – Evolução da ingestão alimentar das proles a partir do desmame até os 180 dias de vida.



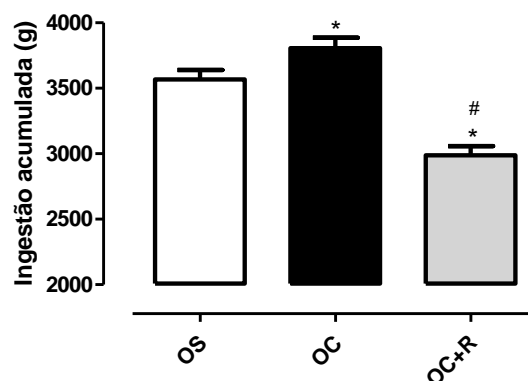
Legenda: OS: óleo de soja (OS); OC: óleo de coco; OC+R: óleo de coco + ração suplementada com óleo de coco; [£] OC Vs OC+R; [§] OC Vs OS; [°] OC+R Vs OS; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=36 para grupo OS; n=40 para grupo OC; e n= 24 para grupo OC+R.

Fonte: A autora, 2018.

A ingestão alimentar acumulada foi avaliada e pode-se observar que o grupo OC, de fato, apresentou maior consumo alimentar total ao longo dos 180 dias de vida quando comparado ao grupo OS (+7%, Figura 26). Em contrapartida, o grupo OC+R consumiu uma menor quantidade de ração em relação tanto ao grupo OS (-16%) quanto ao grupo OC (-21%) ao longo dos 180 dias de vida (Figura 26).

Figura 26 - Ingestão alimentar acumulada das proles durante os 180 dias de vida.



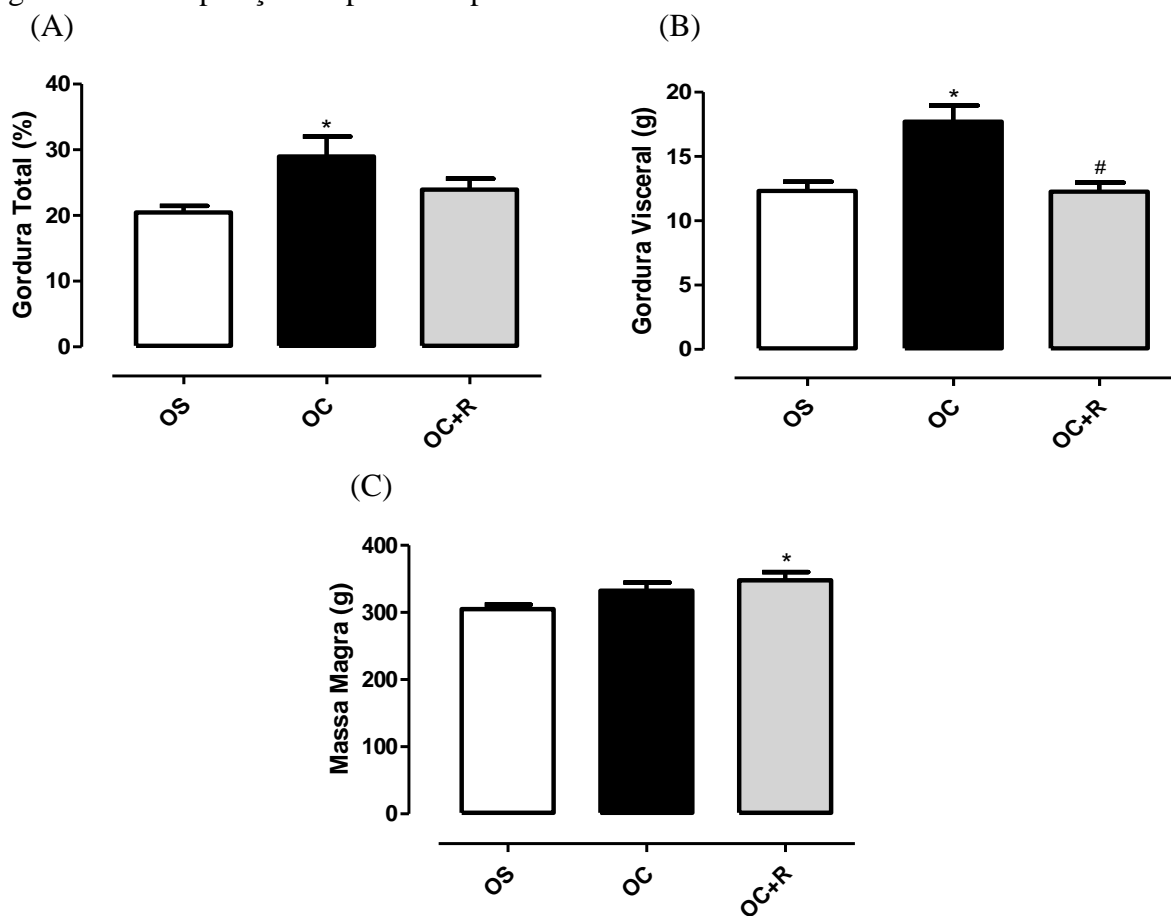
Legenda: OS: óleo de soja; OC: óleo de coco; OC+R: óleo de coco + ração suplementada com óleo de coco; ^{*}Vs OS; [#]Vs OC; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=36 para grupo OS; n=40 para grupo OC; e n= 24 para grupo OC+R.

Fonte: A autora, 2018.

Quanto à composição corporal aos 180 dias de vida, foi observado que o grupo OC apresentou maior % de gordura total quando comparado ao grupo OS (+42%, Figura 27A), não tendo diferido significativamente do grupo OC+R, no entanto ao analisar o conteúdo de gordura visceral, pôde-se observar que o grupo OC apresentou maior conteúdo de gordura visceral tanto em relação ao grupo OS quanto ao OC+R (+44% para ambos os grupos, Figura 27B). Em relação a massa magra, foi observado que o grupo OC+R apresentou maior conteúdo quando comparado ao grupo OS (+14%, Figura 27C).

Figura 27 – Composição corporal das proles aos 180 dias de vida.



Legenda: (A) Percentual de gordura corporal total; (B) conteúdo de gordura visceral; (C) conteúdo de massa magra total; OS: óleo de soja; OC: óleo de coco; OC+R: óleo de coco + ração suplementada com óleo de coco; *Vs OS; #Vs OC; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=10 por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

Aos 180 dias de vida, nenhuma diferença significativa foi encontrada para os níveis de glicose sanguínea, insulina, corticosterona, colesterol e triglicerídeos plasmáticos e colesterol e triglicerídeos hepáticos entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5 - Perfil bioquímico e hormonal das proles aos 180 dias de vida:

	OS	OC	OC+R
180 dias			
Glicose (mg/dl)	89,92 ± 1,799	92,80 ± 1,117	92,54 ± 1,627
Insulina (μIU/ml)	19,74 ± 2,777	21,73 ± 2,494	17,11 ± 1,684
Índice de resistência à insulina (IRI) (μM)	98,66 ± 14,62	116,3 ± 15,56	89,48 ± 9,90
Colesterol plasmático (mg/dl)	55,81 ± 5,700	55,41 ± 5,787	54,13 ± 4,875
Triglicerídeo plasmático (mg/dl)	92,60 ± 14,19	106,3 ± 13,93	73,22 ± 13,68
Corticosterona (ng/ml)	982,1 ± 148,0	1094 ± 174,1	810,5 ± 66,95
Colesterol hepático ((mg/dl)/mg)	1,84 ± 0,18	1,75 ± 0,23	1,67 ± 0,13
Triglicerídeo hepático ((mg/dl)/mg)	1,96 ± 0,08	2,11 ± 0,14	2,01 ± 0,12

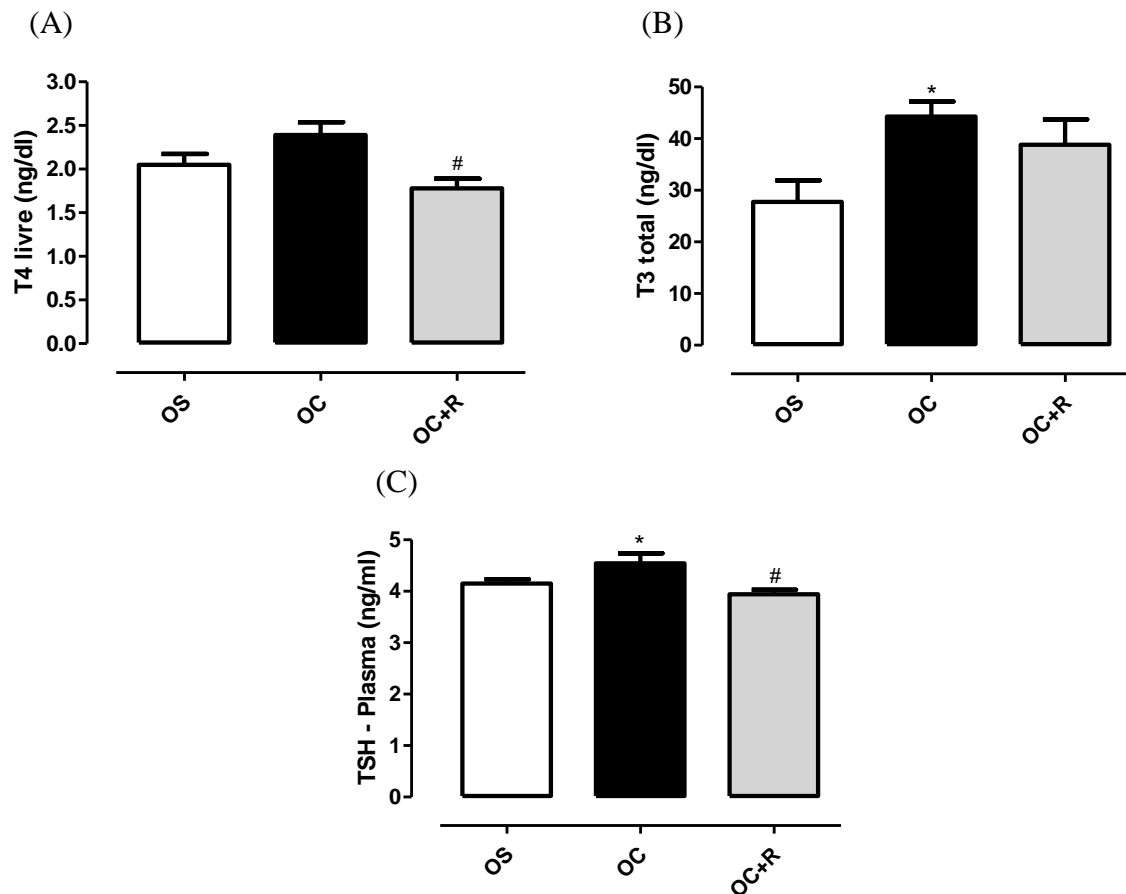
Legenda: OS: óleo de soja; OC: óleo de coco (OC); OC+R: óleo de coco + ração suplementada com óleo de coco.

Nota: Valores expressos em média ± EPM; n=36 para grupo OS; n=40 para grupo OC; e n= 24 para grupo OC+R para análise da glicose e n=10 por grupo para as demais análises.

Fonte: A autora, 2018.

Em relação aos hormônios tireoideanos, observou-se que o grupo OC+R apresentou níveis plasmáticos menores de T4 livre quando comparado ao grupo OC (-26%, Figura 28A) e os níveis de T3 total foram maiores somente no grupo OC quando comparado ao grupo OS (59%, Figura 28B). Contudo, ao analisar os níveis plasmáticos do TSH, foi observado que o grupo OC apresentou maiores níveis deste hormônio tanto em relação ao grupo OS quanto ao grupo OC+R (+10% e +15%, respectivamente, Figura 28C).

Figura 28 - Perfil plasmático de hormônios relacionados a função tireoideana das proles aos 180 dias de vida.



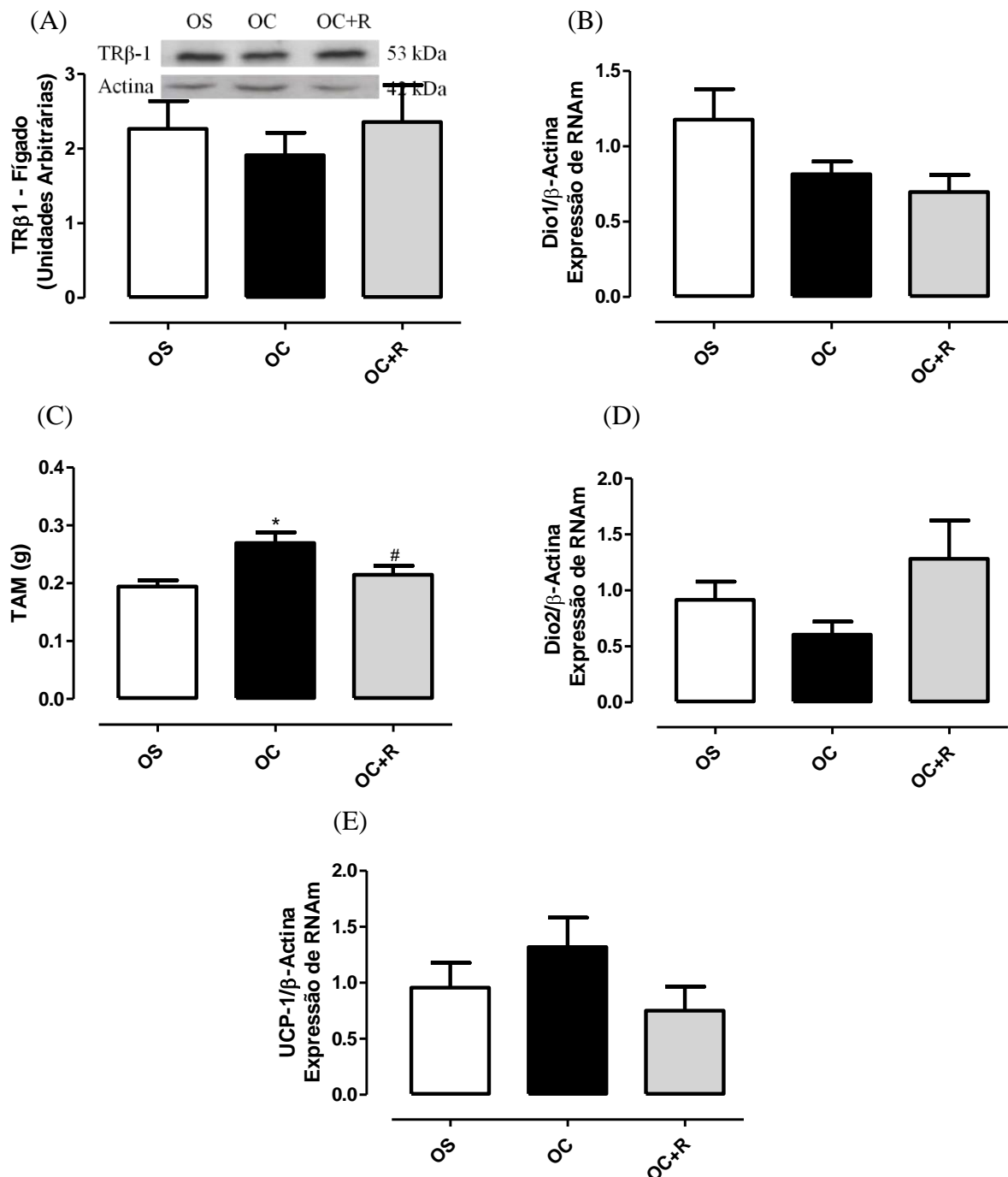
Legenda: (A) Níveis plasmáticos de T4 livre; (B) níveis plasmáticos de T3 total; (C) níveis plasmáticos de TSH; OS: óleo de soja; OC: óleo de coco; OC+R: óleo de coco + ração suplementada com óleo de coco; *Vs OS; #Vs OC; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=10 por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

Marcadores da função tireoideana foram avaliados e nenhuma diferença significativa foi observada no conteúdo de TR β 1 (Figura 29A) e na expressão de RNAm de desidase 1 (Figura 29B) no fígado. Embora tenha sido observado que o TAM do grupo OC era mais pesado quando comparado aos dos grupos OS e OC+R (+39% e + 26%, Figura 29C), nenhuma diferença significativa foi observada na expressão de RNAm de desidase 2 (Figura 29D) e UCP-1 (Figura 29E) neste tecido.

Figura 29 - Marcadores da função tireoideana no fígado e no TAM das proles aos 180 dias de vida



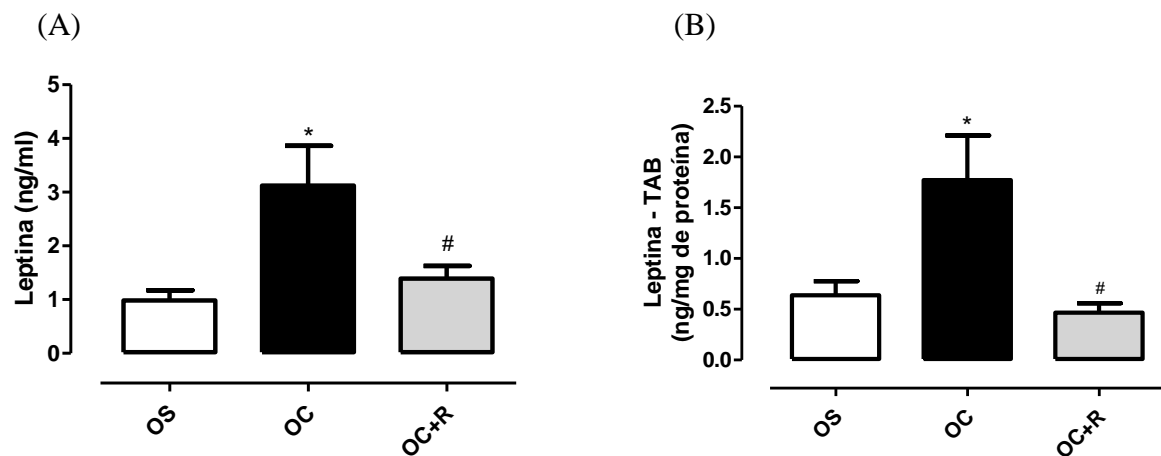
Legenda: (A) Conteúdo de TRβ1 no fígado com imagens das bandas representativas de cada grupo para a proteína de interesse e controle interno (actina); (B) expressão de RNAm de desidase 1 (Dio1) no fígado; (C) peso do TAM; (D) expressão de RNAm de desidase 2 (Dio2) no TAM; (E) expressão de RNAm de UCP-1 no TAM; OS: óleo de soja; OC: óleo de coco; OC+R: óleo de coco + ração suplementada com óleo de coco. *Vs OS; #Vs OC; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; $n = 07$ por grupo para WB e $n = 09$ por grupo para RT-PCR.

Fonte: A autora, 2018.

Ainda sobre o perfil hormonal dos animais aos 180 dias de vida, observou-se que o grupo OC apresentou maiores níveis plasmáticos de leptina quando comparado aos grupos OS e OC+R (2.17 e 1.25 *fold-increase*, respectivamente, Figura 30A). O mesmo perfil foi observado no conteúdo de leptina no tecido adiposo branco retroperitoneal destes animais com o grupo OC apresentando maior conteúdo em relação aos grupos OS e OC+R (1.8 e 2.8 *fold-increase*, Figura 30B).

Figura 30 - Níveis plasmáticos e conteúdo tecidual de leptina das proles aos 180 dias de vida.



Legenda: (A) Níveis plasmáticos de leptina; (B) conteúdo de leptina no tecido adiposo branco retroperitoneal; OS: óleo de soja; OC: óleo de coco; OC+R: óleo de coco + ração suplementada com óleo de coco. *Vs OS; #Vs OC; $p < 0,05$.

Nota: Valores expressos em média \pm EPM; n=10 por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, evidenciamos que o tipo de óleo da dieta ao qual as mães são expostas durante o período da lactação programa a prole adulta de diferentes formas. Alguns tipos de óleos causaram desordens metabólicas na prole adulta, como obesidade, hiperfagia e alterações nos níveis plasmáticos de hormônios tireoideanos, sendo que dentre os óleos estudados, o de coco apresentou maior capacidade de imprinting. Estes dados corroboram estudos que demonstram uma associação entre a exposição a compostos bioativos em períodos críticos da vida e o possível desenvolvimento futuro de doenças crônicas, como a obesidade. Além disso, evidenciamos, que se essa exposição ao óleo de coco perdurar ao longo de toda a vida, os animais se tornam mais bem adaptados e não desenvolvem as alterações metabólicas encontradas quando esta exposição ocorre somente durante a lactação, reforçando a teoria de que a programação trata-se de um fenômeno adaptativo.

5.1 Avaliação nutricional e hormonal das mães e do leite materno

Ao desmame, observamos que somente o óleo de oliva foi capaz de alterar a composição corporal das mães, que apresentaram redução da gordura corporal total, bem como do conteúdo de gordura visceral (gorduras retroperitoneal, mesentérica e ovariana), quando comparado ao grupo OS, sem nenhuma alteração do conteúdo de massa magra. Sugerimos que esta redução no conteúdo de gordura corporal total e visceral ocorra devido à maior atividade lipolítica no tecido adiposo destes animais. De fato, Soriguer et al. (2003) mostraram que uma dieta rica em AGMI n-9, provenientes de óleo de oliva, é capaz de aumentar o conteúdo de ácidos graxos n-9 no tecido adiposo epididimal e omental e, sugere que esses ácidos graxos promovem uma modificação no metabolismo da leptina e que este hormônio sozinho ou interagindo com outros hormônios lipolíticos, como a adrenalina, poderiam estimular a atividade lipolítica no tecido adiposo (WANG; LEE; UNGER, 1999). Além disso, o autor ainda sugere um possível aumento da termogênese uma vez que parece que o óleo de oliva induz uma *up-regulation* do RNAm de UCPs no TAM e no músculo esquelético de ratos, contribuindo assim para o aumento do gasto energético (RODRÍGUEZ et al., 2002).

Outro resultado encontrado no presente estudo que sustenta esse aumento na lipólise foi a maior concentração plasmática de triglicerídeos e colesterol no grupo OO, sugerindo uma maior liberação de lipídios dos compartimentos de armazenamento. Contudo, esse aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol e triglicerídeos não foi refletido no conteúdo hepático destas frações lipídicas, o que sugere que essa maior quantidade de lipídios circulantes não esteja sendo armazenada no fígado. De fato, ao analisarmos a composição bioquímica do leite materno, encontramos um maior aporte de colesterol no leite de mães do grupo OO, que sugere, de certa forma, que esse maior conteúdo de lipídios no plasma esteja sendo passado para o leite materno e sendo ofertado para a sua prole. Esse aumento de colesterol no leite materno do grupo OO proporcionou um aumento no total de calorias ofertadas através do leite para a prole deste grupo.

As mães do grupo OC, embora não tenham apresentado composição corporal alterada, apresentaram concentração de glicose sanguínea menor do que os outros três grupos e maiores níveis de colesterol plasmático que o grupo OS. Estudos sobre os efeitos dos ácidos graxos de cadeia média na homeostase glicêmica propõem uma ação deste tipo de lipídio no aumento da sensibilidade à insulina (ECKEL et al., 1992; NAGAO; YANAGITA, 2010; TURNER et al., 2009) e, alguns sugerem, ainda, que este efeito está relacionado a um aumento nos níveis de adiponectina (MAEDA et al., 2002; NAGAO; YANAGITA, 2010), a qual já foi associada a maior ação da insulina através da ativação da sua cascata de sinalização (OKAMOTO et al., 2006). A redução na glicemia encontrada nas mães do grupo OC, sem alteração nos níveis de insulina, corrobora este estudo, uma vez que o óleo de coco é rico em ácidos graxos de cadeia média. No entanto, não avaliamos os níveis de adiponectina nestes animais. Com relação aos maiores níveis de colesterol plasmático, acreditamos que tenha ocorrido um aumento na fração de HDL-c, uma vez que, neste estudo avaliamos somente os níveis de colesterol total e que já foi demonstrado por Assunção et al. (2009) que a suplementação com óleo de coco é capaz de aumentar os níveis de HDL-c em mulheres com obesidade abdominal. Outra explicação para os níveis de colesterol estarem maiores no plasma das mães do grupo OC é que uma dieta rica em ácidos graxos saturados de cadeia média está associada a um aumento nos níveis de colesterol e triglicerídeos devido a um aumento na síntese *de novo* de ácidos graxos de cadeia longa utilizando o acetil-CoA proveniente da oxidação dos AGSCM (CATER et al., 1997; THOLSTRUP et al., 2004). Esta maior concentração de colesterol plasmático foi refletida na composição do leite materno deste grupo a qual, além de apresentar maior quantidade de colesterol, também apresentou quantidade elevada de triglicerídeos, gerando um aumento nas calorias totais oferecidas pelo leite.

Ainda sobre o leite materno, foi observado que o leite do grupo OC apresentou menor conteúdo de leptina em relação aos outros três grupos, embora nenhuma alteração tenha sido observada em seus níveis plasmáticos. Uma vez que a leptina do leite materno é proveniente da sua produção pela glândula mamária (HASSIOTOU et al., 2014; WEYERMANN et al., 2006) e, também, por passagem deste hormônio da circulação sanguínea da mãe para o leite através de difusão ou por transporte mediado por receptores presentes no tecido mamário (CASABIELL et al., 1997; LAUD et al., 1999), aventamos a possibilidade da produção mamária de leptina ou o seu transporte através de receptores estarem reduzidos, no entanto, não encontramos dados na literatura que associem a ingestão de óleo de coco ou ácidos graxos de cadeia média com esta alteração.

Uma vez que observamos alterações de composição corporal, sugerindo uma alteração no metabolismo e na termogênese, decidimos avaliar os níveis plasmáticos de hormônios tireoideanos e seus marcadores em alguns tecidos. As mães que receberam óleo de oliva, óleo de peixe e óleo de coco apresentaram menores níveis plasmáticos de T4 livre que o grupo suplementado com óleo de soja, sugerindo uma menor síntese deste hormônio nestes grupos. Surpreendentemente, nenhuma diferença foi observada nos níveis de TSH plasmático, o que não era esperado, uma vez que o T4 plasmático é o principal responsável pelo mecanismo de *feedback* negativo do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (PANDA; TURNER, 1968). As mães dos grupos OP e OC apresentaram, ainda, maiores níveis de T3 total comparados às mães do grupo OS, o que sugere que os menores níveis de T4, ao menos nestes grupos, também se devem a maior conversão de T4 em T3, em grande parte, pela ação da desidase 1 (Dio1) nos tecidos periféricos, principalmente fígado e rim. Contudo, ao analisar a expressão de Dio1 no fígado, não foi observada nenhuma diferença. Dessa forma, podemos sugerir que esta maior conversão esteja ocorrendo em outros tecidos, como o tecido renal, ou, ainda, que a atividade enzimática da desidase 1 no fígado esteja aumentada sem alterar sua expressão gênica.

Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos para o conteúdo de TRβ1 no fígado, sugerindo que a ação dos hormônios tireoideanos nesse tecido, aparentemente, não esteja alterada. Avaliamos, ainda, o peso do TAM e a expressão de RNAm de UCP-1 neste tecido a fim de analisar se as alterações plasmáticas nos hormônios tireoideanos foram capazes de promover alguma alteração na termogênese destas mães, uma vez que o hormônio tireoideano é um estimulador da expressão e da atividade da UCP-1 (RIBEIRO et al., 2010), no entanto, nenhuma diferença foi observada entre os grupos tanto para o peso do TAM quanto para a expressão gênica de UCP-1. É importante ressaltar que, neste estudo, foram avaliados somente os níveis de T3 total, o qual corresponde à soma da fração livre de T3 e do

hormônio ligado às proteínas de transporte. Aventamos, então, a possibilidade de que o aumento de T3 total plasmático observado nos grupos OP e OC em relação ao grupo OS tenha ocorrido devido ao aumento de alguma proteína de transporte como, por exemplo, a globulina ligadora de tiroxina (TBG), sem alteração na fração livre do hormônio, o que levaria a uma ação normal do T3 nos tecidos alvo e poderia explicar o fato do TR β 1 hepático e da UCP-1 no TAM não apresentarem nenhuma alteração nestes grupos.

5.2. Avaliação nutricional e hormonal da prole lactente

Assim como foi observado nas mães, ao desmame, somente o óleo de oliva foi capaz de alterar a composição corporal das proles. Contudo, surpreendentemente, a suplementação materna com este óleo promoveu maior peso corporal da prole a partir do 3º dia de vida, maior ganho de peso total e maior conteúdo de gordura total e visceral no momento do desmame, inversamente ao que era esperado uma vez que um maior aporte de AGMI que, teoricamente, é oferecido pelo leite, estaria agindo, como nas mães, estimulando maior atividade lipolítica no tecido adiposo destes animais (SORIGUER et al., 2003). Sugerimos que este resultado inesperado na composição corporal da prole do grupo OO tenha ocorrido, em parte, devido à composição do leite materno deste grupo que se apresentou mais calórico devido à maior quantidade de colesterol presente, além de um possível maior consumo de leite por parte dos filhotes, no entanto, não avaliamos, neste estudo, o consumo de leite das proles.

Embora o leite materno do grupo OC tenha se apresentado mais calórico devido ao maior conteúdo de colesterol e triglicerídeos, a prole deste grupo não apresentou maior peso corporal ou alteração da composição corporal em relação aos outros grupos. Sugerimos que este resultado se deve a maior saciedade dos filhotes deste grupo, devido ao maior conteúdo de triglicerídeos, uma vez que dietas ricas em lipídios proporcionam maior sensação de saciedade (BOADO et al., 1998; CHOI ; PALMQUIST, 1996). E ainda, assumindo que os ácidos graxos de cadeia média do óleo suplementado podem ter passado para a prole através do leite materno, que já foram associados a um aumento da saciedade, contribuindo para o menor ganho de peso corporal (POPPITT et al., 2010; STUBBS; HARBRON, 1996). Este fenômeno não foi observado nas mães que receberam o óleo de coco uma vez que estes animais não apresentaram alteração na ingestão alimentar. Sugerimos que isto tenha ocorrido

devido ao fato que a lactação é uma fase peculiar que pode levar a alterações metabólicas nas mães com impacto na ingestão alimentar como mudanças na resposta a hormônios anorexígenos como a leptina e alterações na circuitaria hipotalâmica que regula a ingestão alimentar e o gasto energético (BROGAN et al., 1999; CHEN et al., 2004).

Com relação ao perfil bioquímico e hormonal das proles ao desmame, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos para glicemia, insulina, IRI, corticosterona, colesterol e triglicerídeos hepáticos, leptina e hormônios tireoideanos. No entanto, observamos menor concentração de colesterol plasmático no grupo OP quando comparado ao grupo OO e de triglicerídeos plasmáticos no grupo OC e OP quando comparados aos grupos OS e OO. De fato, já foi demonstrado na literatura que uma dieta rica em óleo de peixe, e conseqüentemente, em ácidos graxos n-3, é capaz de reduzir os níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídeos, promovendo melhora no perfil lipídico (DAS, 2000; HARRIS, 1989; SHINOZAKI et al., 1996). Além disso, nossos resultados corroboram o estudo de Venturini et al. (2015) que mostrou que a suplementação de óleo de peixe em humanos foi capaz de promover menor concentração de colesterol total e LDL-c em relação a suplementação com óleo de oliva. Em relação ao óleo de coco, um estudo de Xue et al. (2009) mostrou que a suplementação com um óleo rico em AGSCM (uma mistura de triglicerídeos de cadeia longa - TCL - e de cadeia média -TCM) promoveu menores níveis de triglicerídeos plasmáticos em indivíduos chineses quando comparado a suplementação somente com ácidos graxos de cadeia longa. Nossos resultados confirmam esse achado, uma vez que o óleo de coco é rico em TCM e os outros tipos de óleos são ricos em TCL.

Avaliamos, ainda, alguns marcadores da função tireoideana nestas proles e não encontramos diferenças significativas entre os grupos no conteúdo de TR β 1 no fígado e na expressão de RNAm de UCP-1 no TAM, o que já era esperado uma vez que estes animais não apresentaram nenhuma alteração nos hormônios tireoideanos. Contudo, foi observado que os filhotes do grupo OO tinham TAM mais pesado em relação ao grupo OS e, uma vez que a expressão gênica de UCP-1 neste tecido não está alterada e estes animais apresentaram maior adiposidade, sugerimos que poderia estar ocorrendo um processo de “branqueamento” do TAM, que perderia, em parte, sua função termogênica como já foi descrito na literatura (SHIMIZU; WALSH, 2015).

5.3 Avaliação nutricional e hormonal da prole adulta programada por suplementação materna com diferentes tipos de óleos (óleos de soja, oliva, peixe e coco) no período da lactação – Experimento 1

Aos 180 dias de vida, observamos que a suplementação materna com óleo de coco foi a que obteve os efeitos mais significativos na prole adulta, embora o grupo no qual as mães receberam óleo de oliva também tenha apresentado algumas alterações importantes.

Com relação ao peso corporal, observamos que os grupos OC e OO apresentaram maior peso corporal, a partir do dia 73 e dia 133, respectivamente, quando comparados ao grupo OS. Além disso, o grupo OC também apresentou maior peso corporal em relação ao grupo OP. O maior ganho de peso nos grupos OO e OC foi acompanhado por maior adiposidade total nos dois grupos quando comparados ao grupo OS, no entanto, somente o grupo OC apresentou maior conteúdo de gordura visceral em relação aos grupos OS e OP e, ainda, somente o grupo OO apresentou maior conteúdo de massa magra quando comparado ao grupo OS. Um estudo realizado por Magri et al. (2015), em camundongos, mostrou que uma dieta rica em AGSCM, provenientes do óleo de palma, durante a gestação e lactação foi capaz de promover um maior ganho de peso e maior adiposidade visceral e total nas proles adultas, quando comparadas as proles de mães que receberam uma dieta controle com óleo de soja como fonte lipídica. Estes dados sustentam os resultados encontrados no nosso estudo uma vez que o perfil de ácidos graxos do óleo de coco é similar ao do óleo de palma contendo, principalmente, AGSCM.

Contudo, os dados encontrados na literatura sobre o impacto da exposição aos AGSCM durante a lactação no peso corporal da prole ainda são controversos uma vez que um estudo com camundongos no qual este tipo de ácido graxo foi ofertado para as mães durante a lactação e para os filhotes durante a infância observaram menor peso corporal, com redução da adiposidade nas proles adultas jovens, porém o mesmo modelo experimental em ratos não obteve nenhuma alteração significativa (VAN DE HEIJNING et al., 2017).

Observamos que a ingestão alimentar do grupo OC foi maior que dos outros três grupos durante boa parte da vida adulta, no entanto, ao avaliarmos a ingestão acumulada ao longo de toda a vida pós desmame, observamos que o grupo OC apresentou maior ingestão somente quando comparado ao grupo OS. Magri et al. (2015), em seu estudo com um modelo de programação através dos AGSCM, provenientes do óleo de palma, durante a gestação e a lactação, não observaram alteração da ingestão alimentar. De forma similar, Van de Heijning

et al. (2017) também não observaram alteração na ingestão alimentar, tanto de camundongos quanto de ratos, em seu estudo no qual as mães recebiam uma ração contendo uma mistura de óleos com, aproximadamente, 50% de TCM ou uma mistura de óleos vegetais com perfil de ácidos graxos similar a fórmula láctea infantil durante a lactação e, após o desmame, as proles continuavam a receber a mesma dieta do seu respectivo grupo até PN42, a partir do qual todos os animais eram submetidos a uma ração simulando uma dieta estilo ocidental (mesma quantidade de lipídios, porém composição diferente, com maior quantidade de gordura saturada e colesterol) até PN98, quando os dados foram coletados.

Em nosso estudo, os animais do grupo OC, além da hiperfagia, apresentaram maior adiposidade total, e consequente hiperleptinemia, sugerindo uma resistência à ação da leptina no hipotálamo. Em alguns modelos de programação metabólica desenvolvidos pelo nosso laboratório, nos quais foram encontrados obesidade, hiperfagia e hiperleptinemia, dentre outras desordens metabólicas, na vida adulta, foi observado que as proles obesas apresentavam resistência central à leptina com alteração da sua via de sinalização no hipotálamo (LIMA et al., 2011; NOBRE et al., 2012; RODRIGUES et al., 2011; TREVENZOLI et al., 2010). Dessa forma, a resistência à leptina poderia explicar a hiperfagia encontrada no grupo OC uma vez que este hormônio está associado a efeitos anorexígenos (JEANRENAUD; ROHNER-JEANRENAUD, 2001).

Além do grupo OC, observamos que o grupo OO também apresentou maior concentração de leptina no plasma quando comparado ao grupo OS. Esse resultado está de acordo com o aumento da adiposidade total tanto no grupo OO quanto no grupo OC uma vez que a leptina é produzida, principalmente, pelo tecido adiposo (MONTAGUE et al., 1997; WOLF, 1996) e estes grupos apresentam maior conteúdo de gordura corporal. De fato, os grupos OO e OC também apresentaram maior conteúdo de leptina no tecido adiposo branco retroperitoneal quando comparados aos grupos OS e OP, acompanhando a adiposidade encontrada nos mesmos. No caso do grupo OC, especificamente, este resultado sustenta a hipótese citada anteriormente de aumento da ingestão alimentar devido hiperleptinemia e resistência central à leptina.

Com relação ao perfil lipídico, glicemia, insulina e corticosterona, não encontramos alterações significativas entre os grupos. Sobre os hormônios tireoideanos, os grupos OO, OP e OC apresentaram maiores concentrações de T3 total quando comparados ao grupo OS sem nenhuma alteração nos níveis de TSH, o que já era esperado uma vez que os níveis plasmáticos de T4 estavam inalterados e este hormônio, no plasma, é o principal responsável pela regulação da secreção de TSH (PANDA; TURNER, 1968; SALVATORE et al., 2016).

Como já abordado anteriormente, sugerimos que este aumento nos níveis de T3 tenha ocorrido devido a um aumento do processo desiodativo em tecidos periféricos como fígado e rim, contudo, uma vez que a expressão de RNAm de desiodase 1 no fígado não apresentou nenhuma alteração, aventamos a possibilidade que a desiodação estivesse aumentada em outros tecidos, principalmente o rim, ou que a atividade da Dio 1 no fígado estivesse aumentada sem alteração na sua expressão gênica, uma vez que, no presente estudo, não avaliamos a atividade enzimática das desiodases. Observamos, ainda que nenhuma diferença foi encontrada no conteúdo de TR β 1 no fígado, sugerindo que a ação dos hormônios tireoideanos neste tecido não estava alterada. Sendo assim, é importante ressaltar, mais uma vez, que, neste trabalho, foram avaliados os níveis de T3 total e que o aumento nos níveis deste hormônio podem não ter sido refletidos na sua fração livre, promovendo, então, uma ação normal nos tecidos alvo.

Foi observado, ainda, que o grupo OC apresentou TAM mais pesado que os grupos OS e OP e que o grupo OO apresentou maior peso de TAM em relação ao grupo OP, o que poderia implicar em um aumento na termogênese uma vez que este tecido está envolvido com esta função. Além disso, avaliamos a expressão de RNAm de desiodase 2 (Dio 2) no TAM uma vez que esta enzima é a principal responsável pela conversão de T4 em T3 intracelular e que o hormônio tireoideano ativo promove aumento na termogênese, no entanto, nenhuma diferença foi observada na expressão gênica de Dio 2 e de UCP-1 no TAM, mostrando que a termogênese não estava alterada nestes animais. Embora, no presente estudo, não tenhamos avaliado a histologia do TAM, é importante considerar a possibilidade do aumento deste tecido no grupo OC ter ocorrido devido um processo de “branqueamento” uma vez que estes animais são obesos e este fenômeno já foi descrito em modelos de obesidade, promovendo a substituição de tecido adiposo marrom por adipócitos com característica de tecido adiposo branco e prejuízo funcional deste tecido (SHIMIZU; WALSH, 2015). Cabe ressaltar que, em um processo de “branqueamento” do TAM, os marcadores de termogênese encontram-se diminuídos, causando, assim a disfunção do tecido (SHIMIZU; WALSH, 2015); e, no presente estudo, não foram encontradas diferenças na expressão gênica de UCP-1, no entanto, não avaliamos o conteúdo desta proteína e sugerimos a possibilidade de que mecanismos epigenéticos, como os microRNAs, que agem inibindo a tradução de RNAm em proteínas (KIM, 2005; SATO et al., 2011), possam estar atuando, promovendo expressão gênica normal de UCP-1, porém com conteúdo reduzido.

5.4 Avaliação nutricional e hormonal das proles adultas de mães tratadas com óleo de coco na lactação e que continuaram recebendo ração com óleo de coco ao longo da vida – Experimento 2

No experimento 2, observamos que, na vida adulta, o óleo de coco oferecido durante toda a vida foi capaz de prevenir a maioria das alterações endócrino-metabólicas ocasionadas pela programação através da suplementação materna com óleo de coco durante o período da lactação, proporcionando, ainda, alguns efeitos benéficos que caracterizam uma melhor adaptação causada por uma exposição contínua ao óleo de coco desde o nascimento.

Com relação ao peso e composição corporais, observamos que tanto o grupo OC quanto o grupo OC+R apresentaram maior peso corporal durante, praticamente, toda a vida adulta, além de um maior ganho de peso total ao longo da vida quando comparados ao grupo OS. No entanto, enquanto o grupo OC apresentou maior adiposidade total e visceral, o grupo OC+R não apresentou aumento de conteúdo adiposo e, ainda, apresentou maior conteúdo de massa magra. Este resultado nos leva a crer que o aumento de peso corporal encontrado no grupo OC+R se deve a um aumento da massa magra nesses animais, sugerindo que a exposição ao óleo de coco durante toda a vida proporcionou um melhor perfil metabólico da composição corporal neste grupo, no entanto, o mecanismo envolvido no aumento de massa magra associado à ingestão de óleo de coco ainda não está claro.

Nossos dados corroboram o estudo de Magri et al. (2015) que mostraram, em camundongos, que a prole adulta de mães alimentadas com dieta contendo óleo de palma, rico em AGSCM, durante a gestação e a lactação apresentou maior peso corporal e adiposidade que o grupo controle, no qual as mães recebiam uma dieta contendo óleo de soja. Contudo, Gunasekaran et al. (2017) mostraram que camundongos descendentes de mães que receberam dieta suplementada com óleo de coco desde antes da gestação até o desmame e permaneceram recebendo esta dieta até 6 semanas de vida, apresentaram menor ganho de peso corporal em relação ao grupo controle (alimentado com um dieta padrão com AGPI como principal fonte lipídica) e, embora não tenha sido avaliada a composição corporal dos animais, o autor sugere que este menor ganho de peso se deve a redução nos depósitos de gordura.

Sendo assim, alguns estudos têm demonstrado que uma dieta suplementada com óleo de coco promove uma redução na lipogênese e aumento na lipólise e que estes efeitos são mediados, em parte, via mecanismos dependentes de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma do tipo alfa (PPAR α) (ARUNIMA; RAJAMOHAN, 2014; IPPAGUNTA et al.,

2013). Além disso, os triglicerídeos de cadeia média já foram associados com aumento da lipólise através do aumento da expressão, conteúdo e atividade da lipase hormônio sensível, a qual é induzida pela ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) no tecido adiposo branco, sendo, parcialmente, responsável pela redução do acúmulo de gordura em animais alimentados com este tipo de lipídio (LIU et al., 2011). Estes mecanismos podem, em parte, explicar as alterações observadas na gordura corporal dos animais do grupo OC+R comparado ao grupo OC, uma vez que o primeiro recebeu óleo de coco durante toda a vida.

Foi observado que o grupo OC apresentou maiores níveis plasmáticos de leptina quando comparado ao grupo OS e isto foi acompanhado de maior conteúdo de leptina no tecido adiposo branco retroperitoneal. Esses resultados eram esperados uma vez que os animais do grupo OC são obesos, com aumento da adiposidade visceral e total, e que este tecido é o principal responsável pela síntese de leptina e pelos seus níveis plasmáticos (MONTAGUE et al., 1997; WOLF, 1996). Além disso, parece que quando o óleo de coco é oferecido durante toda a vida, essas alterações não ocorrem uma vez que a concentração de leptina no plasma e o conteúdo de leptina no tecido adiposo do grupo OC+R são similares ao do grupo OS e significativamente menores que do grupo OC.

Em relação à ingestão alimentar, observamos hiperfagia no grupo OC quando comparado aos outros dois grupos desde o início da vida pós desmame, o que resultou em maior ingestão alimentar acumulada ao longo da vida. Como já foi discutido anteriormente, sugerimos que a hiperfagia encontrada nestes animais se deve a uma possível resistência central à leptina, com prejuízo no circuito hipotalâmico de controle da saciedade nestes animais como já foi demonstrado em outros modelos de programação metabólica do nosso grupo (LIMA et al., 2011; NOBRE et al., 2012; RODRIGUES et al., 2011; TREVENZOLI et al., 2010).

Todavia, o grupo OC+R apresentou uma menor ingestão alimentar durante toda a vida quando comparado aos grupos OS e OC, resultando em uma menor ingestão acumulada ao longo da vida, tendo, então, um caráter hipofágico em relação aos outros dois grupos. Já foi demonstrado que uma dieta rica em AGSCM proporciona maior saciedade e reduz a ingestão alimentar (POPPITT et al., 2010; STUBBS; HARBRON, 1996), e, embora seus mecanismos de ação ainda sejam controversos, acredita-se que os AGSCM promovam este efeito através do aumento da oxidação lipídica, uma vez que já foi demonstrado que uma redução na oxidação hepática de ácidos graxos foi capaz de estimular a ingestão alimentar através da redução da produção de energia pelo fígado (FRIEDMAN et al., 1999). Nossos resultados corroboram estes dados uma vez que o óleo de coco é rico em AGSCM e pode estar

proporcionando um aumento na saciedade dos animais que o ingerem ao longo da vida. Como mencionado anteriormente, o grupo OC+R apresentou conteúdo de gordura corporal e níveis de leptina plasmática e no tecido adiposo normais.

Não observamos diferença significativa entre os grupos quanto ao perfil bioquímico e as concentrações de insulina e corticosterona, bem como ao índice de resistência à insulina. No entanto, o grupo OC apresentou maiores níveis plasmáticos de TSH e T3 total sem alteração nos níveis de T4 livre. Como já foi abordado anteriormente, cogitamos a possibilidade que este aumento de T3 pode decorrer de um aumento no processo desiodativo a nível periférico, contudo a expressão de RNAm de Dio 1 no fígado e Dio 2 no TAM não apresentaram nenhuma diferença, sugerindo que este aumento no processo desiodativo esteja ocorrendo em outros tecidos ou que a atividade, principalmente, da Dio 1 no fígado esteja aumentada sem alteração da sua expressão gênica. Além disso, apesar dos níveis de T3 estarem elevados no grupo OC, estes animais não apresentaram aumento na ação dos hormônios tireoideanos uma vez que não foram encontradas diferenças no conteúdo de TR β 1 no fígado e na expressão de UCP-1 no TAM. Cabe ressaltar, mais uma vez, o fato de ter sido avaliado somente o T3 total no presente estudo e que este aumento nos seus níveis plasmáticos pode não estar sendo refletido nos níveis da sua fração livre, proporcionando, assim, ação normal dos hormônios tireoideanos nos tecidos-alvo.

Observamos, ainda, que os níveis de TSH no grupo OC estavam aumentados em relação aos grupos OS e OC+R mesmo sem alteração dos níveis de T4 e sugerimos que estes animais poderiam apresentar resistência ao hormônio tireoideano tecido-específica. Sabe-se que os hormônios tireoideanos necessitam de transportadores para atravessar a membrana plasmática e exercer sua ação na transcrição gênica no núcleo de células alvo (HENNEMANN et al., 2001). Os principais transportadores de hormônios tireoideanos já identificados são os transportadores de monocarboxilatos (MCT8 e MCT10), os transportadores de ânions orgânicos (OATP1) e os transportadores de aminoácidos do tipo L (LAT) (BERNAL; GUADAÑO-FERRAZ; MORTE B, 2015). Neste contexto, aventamos a possibilidade dos animais do grupo OC terem algum tipo de alteração neste mecanismo, pelo menos, na hipófise uma vez que os níveis aumentados de T3 não foram capazes de exercer seu efeito neste tecido e os níveis de T4 circulante não correspondem ao TSH aumentado observado nestes animais.

Avaliamos, também, o peso do TAM destes animais e observamos que o TAM do grupo OC era mais pesado que o dos grupos OS e OC+R, sugerindo uma possível atividade termogênica aumentada que não foi comprovada devido aos níveis normais de UCP-1 neste

tecido. Uma vez que estes animais são obesos, sugerimos, mais uma vez, que esteja ocorrendo uma substituição das células adiposas marrom por tecido adiposo branco com perda parcial de função neste tecido (SHIMIZU; WALSH, 2015).

Os animais do grupo OC+R não apresentaram as alterações no metabolismo tireoideano e no TAM observadas no grupo OC, sugerindo que a exposição ao óleo de coco durante toda a vida preveniu tais alterações causadas pela ingestão de óleo de coco somente no período da lactação.

Vale ressaltar que mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais o óleo de coco e o óleo de oliva promovem suas alterações a curto e a longo prazos, bem como estudos que avaliem o efeito da suplementação com o óleo de oliva ao longo de toda a vida, como foi feito com o óleo de coco no presente estudo, a fim de avaliar se a exposição continuada a este óleo também evitaria os efeitos da programação.

CONCLUSÃO

Demonstramos, no presente estudo que, mesmo em pequenas doses diárias, a suplementação de mães lactantes com alguns óleos é capaz de promover alterações nas mães e proles. O óleo de oliva modificou o perfil metabólico, a curto prazo, tanto nas mães lactantes quanto em suas proles no início da vida; e, tanto o óleo de oliva quanto o óleo de coco alteraram a composição do leite materno. Além disso, demonstramos que essas alterações a curto prazo ocasionadas pela suplementação materna com óleo de oliva e óleo de coco programaram as suas proles para alterações endócrino-metabólicas na vida adulta, como obesidade, hiperfagia e alterações nos níveis plasmáticos de hormônios tireoideanos; e, ainda, que uma continuidade na exposição ao óleo de coco durante toda a vida parece ser capaz de prevenir a maior parte destas alterações geradas pela programação metabólica e, ainda, promover um melhor perfil metabólico.

Nossos resultados da exposição ao óleo de coco reforçam o conceito de que a programação metabólica causa alterações nos processos fisiológicos e que, se o indivíduo continua exposto às condições ambientais do início da vida, ele, provavelmente, será melhor adaptado, no entanto, se as condições forem alteradas, ele terá maior risco de desenvolver disfunções metabólicas.

REFERÊNCIAS

- ALARCÓN DE LA LASTRA, C. et al. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Curr Pharm Des.*, v.7, n.10, p.933-950, July, 2001.
- ALVHEIM, A.R. et al. Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-arachidonoylglycerol and anandamide in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and mice, and induces weight gain and inflammation in mice. *Br J Nutr.*, v.109, n.8, p.1508-1517, Apr., 2013.
- ALVHEIM, A.R. et al. Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-AG and anandamide and induces obesity. *Obesity (Silver Spring)*, v.20, n.10, p.1984-1994, Oct., 2012.
- ARUNIMA, S.; RAJAMOHAN, T. Influence of virgin coconut oil-enriched diet on the transcriptional regulation of fatty acid synthesis and oxidation in rats – a comparative study. *Br J Nutr.*, v.111, n.10, p.1782-1790, May, 2014.
- ASSUNÇÃO, M.L. et al. Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity. *Lipids.*, v.44, n.7, p.593-601, July, 2009.
- BABA, N.; BRACCO, E.F.; HASHIM, S.A. Role of brown adipose tissue in thermogenesis induced by overfeeding a diet containing medium chain triglyceride. *Lipids.*, v.22, n.6, p.442-444, June, 1987.
- BABAYAN, V.K. Medium chain triglycerides and structured lipids. *Lipids.*, v.22, n.6, p.417-420, June, 1987.
- BARGUT, T.C. et al. Mice fed fish oil diet and upregulation of brown adipose tissue thermogenic markers. *Eur J Nutr.*, v.55, n.1, p.159-169, Feb., 2016.
- BARKER, D.J. The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol.*, v.18, n.8, p.733-736, 2003.
- BARKER, D.J. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest.*, v.25, n.7, p.457-463, July, 1995.
- BENATTI, R.O. et al. Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and microRNA-122 (miR-122) and microRNA-370 (miR-370) expression in offspring. *Br J Nutr.*, v.111, n.12, p.2112-2122, June, 2014.
- BENETOU, V. et al. Conformity to traditional Mediterranean diet and cancer incidence: the Greek EPIC cohort. *Br J Cancer.*, v.99, n.1, p.191-195, July, 2008.
- BERNAL, J.; GUADAÑO-FERRAZ, A.; MORTE, B. Thyroid hormone transporters functions and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol.*, v.11, n.7, p.406-417, July, 2015.
- BISPO, K.P. et al. Trans and interesterified fat and palm oil during the pregnancy and lactation period inhibit the central anorexigenic action of insulin in adult male rat offspring. *J Physiol Sci.*, v.65, n.1, p.131-138, Jan., 2015.

BLASBALG, T. et al. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr.* v.93, n.5, p.950-962, May, 2011.

BOADO, R.J. et al. Up-regulation of blood-brain barrier short-form leptin receptor gene products in rats fed a high fat diet. *J Neurochem.*, v.71, n.4, p.1761-1764, Oct., 1998.

BONOMO, I.T. et al. Prolactin inhibition in lactating rats changes leptin transfer through the milk. *Horm Metab Res.*, v. 37, p.220-225, Apr., 2005.

BOON YIN, K.; NAJIMUDIN, N.; MUHAMMAD, T.S. The PPAR γ coding region and its role in visceral obesity. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.371, n.2, p.177-179, June, 2008.

BREIER, B.H. et al. Fetal programming of appetite and obesity. *Mol Cell Endocrinol.*, v.185, n.1-2, p.73-79, Dec., 2001.

BRINGHENTI, I. et al. An early fish oil-enriched diet reverses biochemical, liver and adipose tissue alterations in male offspring from maternal protein restriction in mice. *J Nutr Biochem.*, v.22, n.11, p.1009-1014, Nov., 2011.

BROGAN, R.S. et al. Suppression of leptin during lactation: contribution of the suckling stimulus versus milk production. *Endocrinology.*, v.140, n.6, p.2621-2627, June, 1999.

BUCKLEY, J.D.; HOWE, P.R. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity-a review. *Nutrients*, v.2, n.12, p.1212-1230, Dec., 2010.

BUENO, A.A. et al. Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue. *Pflugers Arch.*, v.455, n.4, p.701-709, Jan., 2008.

BURDGE, G.C., CALDER, P.C. Dietary alpha-linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. *Nutr Res Rev.*, v.19, n.1, p.26-52, June, 2006.

CALDER, P.C. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr.*, v.142, n.3, p.592S-599S, Mar., 2012.

CARVALHO, J.C. et al. Maternal prolactin inhibition causes changes in leptin at 22- and 30-day-old pups. *Horm Metab Res.*, v.47, n.7, p.528-536, June, 2015.

CASABIELL, X. et al. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.82, n.12, p.4270-4273, Dec., 1997

CATER, N.B.; HELLER, H.J.; DENKE, M.A. Comparison of the effects of medium-chain triacylglycerols, palm oil, and high oleic acid sunflower oil on plasma triacylglycerol fatty acids and lipid and lipoprotein concentrations in humans. *Am J Clin Nutr.*, v.65, n.1, p.41-45, Jan., 1997.

- CHAMMA, C.M. et al. A rich medium-chain triacylglycerol diet benefits adiposity but has adverse effects on the markers of hepatic lipogenesis and beta-oxidation. *Food Funct.*, v.8, n.2, p.778-787, Feb., 2017.
- CHAMP, M.; HOEBLER, C. Functional food for pregnant, lactating women and in perinatal nutrition: a role for dietary fibres? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*, v.12, n.6, p.565-574, Nov., 2009.
- CHEN, P. et al. Melanocortin 4 receptor-mediated hyperphagia and activation of neuropeptide Y expression in the dorsomedial hypothalamus during lactation. *J Neurosci.*, v.24, n.22, p.5091-5100, June, 2004.
- CHOI, B.R.; PALMQUIST, D.L. High fat diets increase plasma cholecystokinin and pancreatic polypeptide, and decrease plasma insulin and feed intake in lactating cows. *J Nutr.*, v.126, n.11, p.2913-2919, Nov., 1996.
- CHOUDHARY, M.; GROVER, K. Development of functional food products in relation to obesity. *Functional Foods in Health and Disease*, v.2, n.6, p.188-197, June, 2012.
- CHOWDHURY, R. et al. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.*, v.160, n.6, p.398-406, Mar., 2014.
- CONCEIÇÃO, E.P.S. et al. Neonatal overfeeding causes higher adrenal catecholamine content and basal secretion and liver dysfunction in adult rat. *Eur J Nutr.*, v.52, p.1393-1404, June, 2013a.
- CONCEIÇÃO, E.P.S. et al. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition role of insulin resistance. *J NutrBiochem.*, v.24, p.81-87, Jan., 2013b.
- DA COSTA, C.A.S. et al. Abdominal adiposity, insulin and bone quality in young male rats fed a high-fat diet containing soybean or canola oil. *Clinics (Sao Paulo)*, v.66, n.10, p.1811-1816, Oct., 2011.
- DAS, U.N. Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v.63, n.6, p.351-362, Dec., 2000.
- DE MOURA, E.G.; LISBOA, P.C.; PASSOS, M.C.F. Neonatal programming of neuroimmunomodulation-role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation.*, v.15, n.3, p.176-188, Sept., 2008.
- DEOL, P. et al. Soybean Oil Is More Obesogenic and Diabetogenic than Coconut Oil and Fructose in Mouse: Potential Role for the Liver. *PLoS One*, v.10, n.7, p.1-31, July, 2015.
- DUTRA, S.C. et al. Liver deiodinase activity is increased in adult rats whose mothers were submitted to malnutrition during lactation. *Horm Metab Res.*, v.35, n.4, p.268-270, Apr., 2003.
- ECKEL, R.H. et al. 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart

Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*, v.129, Suppl 2, p.S76-99, June, 2014.

ECKEL, R.H. et al. Dietary substitution of medium-chain triglycerides improves insulin-mediated glucose metabolism in NIDDM subjects. *Diabetes*, v.41, n.5, p.641-647, May, 1992.

FAGUNDES, A.T. et al. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr.*, v.98, n.5, p.922-928, Nov., 2007.

FAY, M.P. et al. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res.*, v.57, n.18, p.3979-3988, Sept., 1997.

FERNANDES, F.S. et al. Dietary lipids during early pregnancy differently influence adipose tissue metabolism and fatty acid composition in pregnant rats with repercussions on pup's development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, v.86, n.4-5, p.167-174, Apr., 2012.

FIGUEIREDO, M.S. et al. Adipocyte morphology and leptin signaling in rat offspring from mothers supplemented with flaxseed during lactation. *Nutrition*. v.28, p.307-315, Mar., 2012.

FLACHS, P. et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia*, v.48, n.11, p.2365-2375, Nov., 2005.

FRAGA-MARQUES, M.C. et al. Effects of maternal hyperleptinaemia during lactation on memory/learning, anxiety-like and novelty-seeking behavioural traits of adult male rats. *Behav Brain Res.*, v.206, p.147-150, Jan., 2010.

FRANCO, J.G. et al. Resveratrol attenuates oxidative stress and prevents steatosis and hypertension in obese rats programmed by early weaning. *J Nutr Biochem.*, v.24, n.6, p.960-966, June, 2013.

FRIEDMAN, M.I. et al. Fatty acid oxidation affects food intake by altering hepatic energy status. *Am J Physiol.*, v.276, n4, p. R1046-R1053, Apr., 1999.

GALVÃO CÂNDIDO, F. et al. Consumption of extra virgin olive oil improves body composition and blood pressure in women with excess body fat: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical Trial. *Eur J Nutr.*, Aug., 2017. doi: 10.1007/s00394-017-1517-9. [Epub ahead of print]

GARLAND, M. et al. The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. *Am J Clin Nutr*, v.67, n.1, p.25-30, Jan., 1998.

GILLINGHAM, L.G., HARRIS-JANZ, S., JONES, P.J. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids*, v.46, n.3, p.209-228, Mar., 2011.

GUARDA, D.S. et al. Flaxseed oil during lactation changes milk and body composition in male and female suckling pups rats. *Food Chem Toxicol.*, v.69, p.69-75, July, 2014.

- GUASCH-FERRÉ, M. et al. Olive oil consumption and risk of type 2 diabetes in US women. *Am J Clin Nutr.*, v.102, n.2, p.479-486, Aug., 2015.
- GUNASEKARAN, R. et al. Maternal intake of dietary virgin coconut oil modifies essential fatty acids and causes low body weight and spiky fur in mice. *BMC Complement Altern Med.*, v.17, n.1, Jan., 2017.
- HAMMAD, S., PU, S., JONES, P.J. Current Evidence Supporting the Link Between Dietary Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *Lipids*, v.51, n.5, p.507-517, May, 2016.
- HANSEN, P.A. et al. DHEA protects against visceral obesity and muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol.*, v.273, n.5, p.R1704–R1708, Nov., 1997.
- HARRIS, W.S. et al. Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation.*, v.119, n.6, p.902-907, Feb., 2009.
- HARRIS, W.S. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J Lipid Res.*, v.30, n.6, p.785-807, June, 1989.
- HASSIOTOU, F. et al. Mammary cells synthesize appetite hormones that may contribute to breast milk. *FASEB J.*, v.28, n.1, Apr., 2014.
- HENNEMANN, G. et al. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev.*, v.22, n.4, p.451-476, Aug., 2001.
- HOU, M. et al. The effects of dietary fatty acid composition in the post-sucking period on metabolic alterations in adulthood: can ω 3 polyunsaturated fatty acids prevent adverse programming outcomes? *J Endocrinol.*, v.215, n.1, p.119-127, Oct., 2012.
- HU, F.B.; VAN DAM, R.M.; LIU, S. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia*, v.44, n.7, p.805–817, July, 2001.
- IPPAGUNTA, S. et al. Dietary CLA-induced lipolysis is delayed in soy oil-fed mice compared to coconut oil-fed mice. *Lipids*, v.48, n.11, p.1145-1155, Nov., 2013.
- JEANRENAUD, B.; ROHNER-JEANRENAUD, F. Effects of neuropeptides and leptin on nutrient partitioning: dysregulations in obesity. *Annu Rev Med.*, v.52, p.339-351, 2001.
- KALUPAHANA, N. S. et al. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. *J Nutr.*, v.140, n.11, p.1915-1922, Nov., 2010.
- KASAI, M. et al. Comparison of diet-induced thermogenesis of foods containing medium-versus long-chain triacylglycerols. *J Nutr Sci Vitaminol. (Tokyo)*, v.48, n.6, p.536-540, Dec., 2002

- KHRAMOV, V.A.; KOLOMEITSEVA, A.S.; PAPICHEV, N.V. Jaffe color test-based microtechnique for determination of milk lactose. *Gig Sanit.*, v.3, p.86–87, May-June., 2008.
- KIM, V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v.6, n.5, p.376-385, May, 2005.
- KRIS-ETHERTON, P.M. et al. Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: dietary fatty acids. *J Am Diet Assoc.*, v.107, n.9, p.1599-1611, Sept., 2007.
- KRIS-ETHERTON, P.M., HECKER, K.D., BINKOSKI, A.E. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health. *Nutr Rev.*, v.62, n.11, p.414-426, Nov., 2004.
- LAMARCHE, B., COUTURE, P. It is time to revisit current dietary recommendations for saturated fat. *Appl Physiol Nutr Metab.*, v.39, n.12, p.1409-1411, Dec., 2014.
- LANGLEY-EVANS, S.C., MCMULLEN, S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract.*, v.19, p.87-98, 2010.
- LAUD, K. et al. Detection and regulation of leptin receptor mRNA in ovine mammary epithelial cells during pregnancy and lactation. *FEBS Lett.*, v.463, n.1-2, p.194-198, Dec., 1999.
- LAVIE, C.J. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol.*, v.54, n.7, p.585-594, Aug., 2009.
- LIMA, N. DA S. et al. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. *Br J Nutr.*, v.105, n.9, p.1405-1413, May, 2011.
- LIMA, N.S. et al. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res.*, v.45, p.22-30, Jan., 2013.
- LISBOA, P.C. et al. Leptin and prolactin, but not corticosterone, modulate body weight and thyroid function in protein malnourished lactating rats. *Horm Metab Res.*, v.38, n.5, p.295-299, May, 2006.
- LISBOA, P.C. et al. Postnatal Low Protein Diet Programs Leptin Signaling in the Hypothalamic-Pituitary- Thyroid Axis and Pituitary TSH Response to Leptin in Adult Male Rats. *Horm Metab Res.*, v.44, p.114-122, Feb., 2012.
- LIU, Y. et al. Triglyceride with medium-chain fatty acids increases the activity and expression of hormone-sensitive lipase in white adipose tissue of C57BL/6J mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* v.75, n.10, p.1939-1944, 2011.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.*, v.25, n.4, p.402-408, Dec., 2001.

- LÓPEZ, S. et al. Distinctive postprandial modulation of beta cell function and insulin sensitivity by dietary fats: monounsaturated compared with saturated fatty acids. *Am J Clin Nutr.*, v.88, n.3, p.638-644, Sept., 2008.
- MAEDA, N. et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med.*, v.8, n.7, p.731-737, July, 2002.
- MAGRI, T.P. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat in maternal diet can predispose obesity in adult male offspring. *Clin Nutr.*, v.34, n.5, p.904-910, Oct., 2015.
- MARINA, A.M. et al. Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. *Int J Food Sci Nutr.*, v.60, Suppl 2, p.114-123, Aug., 2009.
- MARTÍNEZ-LAPISCINA, E.H. et al. Virgin olive oil supplementation and long-term cognition: the PREDIMED-NAVARRA randomized, trial. *J Nutr Health Aging.*, v.17, n.6, p.544-552, 2013.
- MIDTBO, L.K. et al. Intake of farmed Atlantic salmon fed soybean oil increases insulin resistance and hepatic lipid accumulation in mice. *PLoS One.*, v.8, n.1, p.1-1, Jan., 2013.
- MISAN, V. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat during the perinatal period produces changes in the brain fatty acids profile and increases leukocyte-endothelial interactions in the cerebral microcirculation from the male offspring in adult life. *Brain Res.*, v.1616, p.123-133, Aug., 2015.
- MONTAGUE, C.T. et al. Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes*, v.46, n.3, p.342-347, Mar., 1997.
- MOURA, E.G. et al. Thyroid function and body weight programming by neonatal hyperthyroidism in rats – The role of leptin and deiodinase activities. *Horm Metab Res.*, v.40, n.1, p.1-7, Jan., 2008.
- MOURA, E.G., PASSOS, M.C.F. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep.*, v.25, n.3-4, p.251-269, June, 2005.
- MUMME, K., STONEHOUSE, W. Effects of medium-chain triglycerides on weight loss and body composition: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Acad Nutr Diet.*, v.115, n.2, p.249-263, Feb., 2015.
- NAGAO, K., YANAGITA, T. Medium-chain fatty acids: functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Pharmacol Res.*, v.61, n.3, p.208-212, Mar., 2010.
- NESCHEN, S. et al. n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner. *Diabetes*, v.56, n.4, p.1034-1041, Apr., 2007.

NOBRE, J.L. et al. Calcium supplementation prevents obesity, hyperleptinaemia and hyperglycaemia in adult rats programmed by early weaning. *Br J Nutr.*, v.107, n.7, p.979-988, Apr., 2012.

OKAMOTO, Y. et al. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond).*, v.110, n.3, p.267-278, Mar., 2006.

OLIVEIRA, E. et al. Neonatal hypothyroidism caused by maternal nicotine exposure is reversed by higher T3 transfer by milk after nicotine withdraw. *Food Chem Toxicol.*, v.49, p.2068-2073, Sept., 2011.

OLIVEIRA, E. et al. Neonatal nicotine exposure causes insulin and leptin resistance and inhibits hypothalamic leptin signaling in adult rat offspring. *J Endocrinol.*, v.206, n.1, p.55-63, July, 2010.

OLIVEIRA, E. et al. Short- and long-term effects of maternal nicotine exposure during lactation on body adiposity, lipid profile, and thyroid function of rat offspring. *J Endocrinol.*, v.202, n.3, p.397-405, Sept., 2009.

OOSTING, A. et al. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids prevent excessive fat deposition in adulthood in a mouse model of postnatal nutritional programming. *Pediatr Res.*, v.68, n.6, p.494-499, Dec., 2010.

PANCHENKO, P.E. et al. Epigenetics and Nutrition: maternal nutrition impacts on placental development and health of offspring. *Biol Aujourd'hui.*, v.209, n.2, p.175-187, 2015.

PANDA, J.N.; TURNER, C.W. Thyroxine feed-back on the regulation of thyrotropin [TSH] secretion. *J Physiol.*, v.195, n.1, p.29-37, Mar., 1968.

PASSOS, M.C.F. et al. Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult rats whose mothers were malnourished during lactation. *Horm Metab Res.*, v.36, n.9, p.625-629, Sept., 2004.

PASSOS, M.C.F. et al. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Horm Metab Res.*, v.34, n.1, p.40-43, Jan., 2002.

PASSOS, M.C.F.; RAMOS, C.F.; MOURA, E.G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition Research*, v.20, n.11, p.1603-1610, Nov., 2000.

PATTERSON, E. et al. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Metab.*, v.2012, p.1-16, Apr., 2012.

PEIXOTO-SILVA, N. et al. Does bromocriptine play a role in decreasing oxidative stress for early weaned programmed obesity? *Life Sci.*, v.95, n.1, p.14-21, Jan., 2014.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.*, v.83, n.2, p.346-356, Dec., 1977.

- PINHEIRO, C.R. et al. Exposure to nicotine increases dopamine receptor content in the mesocorticolimbic pathway of rat dams and offspring during lactation. *Pharmacol Biochem Behav.* v.136, p.87-101, Sept., 2015.
- POPPITT, S.D. et al. Fatty acid chain length, postprandial satiety and food intake in lean men. *Physiol Behav.*, v.101, n.1, p.161-167, Aug., 2010.
- PORTHA, B. et al. Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility. *Biochimie.*, v.97, p.1-15, Feb., 2014
- POUDYAL, H. et al. Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *J Nutr Biochem.*, v.23, n.2, p.153-162, Feb., 2012.
- RACLOT, T.; GROSCOLAS, R. Individual fish-oil n-3 polyunsaturated fatty acid deposition and mobilization rates for adipose tissue of rats in a nutritional steady state. *Am J Clin Nutr.*, v.60, n.1, p.72-78, July, 1994.
- RAZQUIN, C. et al. A 3 years follow-up of a Mediterranean diet rich in virgin olive oil is associated with high plasma antioxidant capacity and reduced body weight gain. *Eur J Clin Nutr.*, v.63, n.12, p.1387-1393, Dec., 2009.
- REMACLE, C.; REUSENS, B. *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease*, 1^a Ed. Bélgica: Université Catholique de Louvain. p.17-56. 2004.
- RIBEIRO, M.O. et al. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*, v.151, n.1, p.432-440, Jan., 2010.
- RODRIGUES, A.L. et al. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem.*, v.22, n.2, p.109-117, Feb., 2011.
- RODRÍGUEZ, V.M. et al. Olive oil feeding up-regulates uncoupling protein genes in rat brown adipose tissue and skeletal muscle. *Am J Clin Nutr.*, v.75, n.2, p.213-220, Feb., 2002.
- ROSE, D.P. Dietary fatty acids and cancer. *Am J Clin Nutr.*, v.66, Suppl 4, p.998S-1003S, Oct., 1997.
- RUSSO, G.L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol.*, v.77, n.6, p.937-946, Mar., 2009.
- SACKS, F.M.; KATAN, M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *Am J Med*, v. 113, Suppl 9B, p.13S-24S, Dec., 2002.
- SALVATORE, D.; DAVIES, T.F.; SCHLUMBERGER, M.; HAY, I.D.; LARSEN, P.R. Título: Thyroid Physiology and Diagnostic Evaluation of Patients With Thyroid Disorders. In:

Melmed, S.; Polonsky, K.; Larsen, P.R.; Kronenberg, H. *Williams Textbook of Endocrinology*. 13^a Ed. Filadélfia: Elsevier, p. 334-368, 2016.

SAMANE, S. et al. Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Metabolism*, v.58, n.7, p.909-919, July, 2009.

SANTOS-SILVA, A.P. et al. Endocrine effects of tobacco smoke exposure during lactation in weaned and adult male offspring. *J Endocrinol.*, v. 218, n.1, p.13-24, May, 2013.

SANTOS-SILVA, A.P. et al. Maternal tobacco smoke exposure during lactation inhibits catecholamine production by adrenal medullae in adult rat offspring. *Horm Metab Res.*, v.44, p.550-554, June, 2012.

SANTOS-SILVA, A.P. et al. Neonatal nicotine exposure alters leptin signaling in the hypothalamus-pituitarythyroid axis in the late postnatal period and adulthood in rats. *Life Sci.*, v.87, n.5-6, p.187-195, July, 2010.

SATO, F. et al. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* v.278, n.10, p.1598-609, May, 2011.

SCHAEFER, E.J. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am J Clin Nutr.*, v.75, n.2, p.191-212, Feb., 2002.

SHIMIZU, I.; WALSH, K. The whitening of brown fat and its implications for weight management in obesity. *Curr Obes Rep.*, v.4, n.2, p.224-229, June, 2015.

SHINOZAKI, K et al. The long-term effect of eicosapentaenoic acid on serum levels of lipoprotein(a) and lipids in patients with vascular disease. *J Atheroscler Thromb.*, v.2, n.2, p.107-109, 1996.

SILVA, S. et al. Impact of a 6-wk olive oil supplementation in healthy adults on urinary proteomic biomarkers of coronary artery disease, chronic kidney disease, and diabetes (types 1 and 2): a randomized, parallel, controlled, double-blind study. *Am J Clin Nutr.*, v.101, n.1, p.44-54, Jan., 2015.

SIMOPOULOS, A.P. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients.*, v.8, n.3, p.128, Mar., 2016.

SOFI, F. et al. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.*, v.92, n.5, p.1189-1196, Nov., 2010.

SORIGUER, F. et al. Monounsaturated n-9 fatty acids and adipocyte lipolysis in rats. *Br J Nutr.*, v.90, n.6, p.1015-1022, Dec., 2003.

SOUZA, L.L. et al. Effects of dietary fish oil on thyroid hormone signaling in the liver. *J Nutr Biochem.*, v.21, n.10, p.935-940, Oct., 2010.

STANSBIE, D. et al. Acute effects in vivo of antiinsulin serum on rates of acids synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxilase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *Biochem J*, v.160, p.413-6, Nov., 1976.

STAUFFER, C.E. A linear standard curve for the Folin Lowry determination of protein. *Anal Biochem.*, v.69, n.2, p.646-648, Dec., 1975.

ST-ONGE, M.P., JONES, P.J. Physiological effects of medium-chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity. *J Nutr.*, v.132, n.3, p.329-332, Mar., 2002.

STUBBS, R.J.; HARBRON, C.G. Covert manipulation of the ratio of medium to long-chain triglycerides in isoenergetically dense diets: effect on food intake in ad libitum feeding men. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, v.20, n.5, p.435-444, May, 1996.

SUNDARAM, S. et al. High-Fat Diets Containing Different Amounts of n3 and n6 Polyunsaturated Fatty Acids Modulate Inflammatory Cytokine Production in Mice. *Lipids*, Dec., 2015.

TAKAHASHI, Y.; IDE, T. Dietary n-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. *Br J Nutr.*, v.84, n.2, p.175-184, Aug., 2000.

TEIXEIRA, C.V. et al. Leptin serum concentration in rats whose mothers were submitted to malnutrition during lactation. *J Nutr Biochem.*, v.13, n.8, p.493-498, Aug., 2002.

THOLSTRUP, T. et al. Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities. *Am J Clin Nutr.*, v.79, n.4, p.564-569, Apr., 2004.

TOSTE, F.P. et al. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr.*, v.95, n.4, p.830-837, Apr., 2006.

TREVENZOLI, I.H. et al. Leptin treatment during lactation programs leptin synthesis, intermediate metabolism, and liver microsteatosis in adult rats. *Horm Metab Res.*, v.42, n.7, p.483-490, June, 2010.

TREVENZOLI, I.H., VALLE, M.M.R., MACHADO, F.B. Neonatal hyperleptinemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J Physiol.*, v.580, p.629-637, Apr., 2007.

TROINA, A.A. et al. Flaxseed bioactive compounds change milk, hormonal and biochemical parameters of dams and offspring during lactation. *Food Chem Toxicol.* v.50, p.2388-2396, July, 2012.

TURNER, N. et al. Enhancement of muscle mitochondrial oxidative capacity and alterations in insulin action are lipid species dependent: potent tissue-specific effects of medium-chain fatty acids. *Diabetes*, v.58, n.11, p.2547-2554, Nov., 2009.

URPI-SARDA, M. et al. Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. *Pharmacol Res.*, v.65, n.6, p.577-583, June, 2012.

VALENTE, F.X. et al. Effects of coconut oil consumption on energy metabolism, cardiometabolic risk markers, and appetitive responses in women with excess body fat. *Eur J Nutr.*, Apr., 2017. doi: 10.1007/s00394-017-1448-5. [Epub ahead of print]

VAN DE HEIJNING, B.J.M. et al. An Increased Dietary Supply of Medium-Chain Fatty Acids during Early Weaning in Rodents Prevents Excessive Fat Accumulation in Adulthood. *Nutrients.*, v.9, n.6, E631, June, 2017.

VENTURINI, D. et al. Effects of extra virgin olive oil and fish oil on lipid profile and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Nutrition.*, v.31, n.6, p.834-840, June, 2015.

VICENTE, L.L. et al. Malnutrition during lactation is associated with higher expression of leptin receptor in pituitary of the adult offspring. *Nutrition*, v.20, n.10 ,p.924–928, Oct., 2004

WANG, M.Y.; LEE, Y.; UNGER, R.H. Novel form of lipolysis induced by leptin. *J Biol Chem.*, v.274, n.25, p.17541-17544, June, 1999.

WEYERMANN, M. et al. Adiponectin and leptin in maternal serum, cord blood, and breast milk. *Clin Chem.*, v.52, n.11, p.2095-2102, Nov., 2006.

WOLF, G. Leptin: the weight-reducing plasma protein encoded by the obese gene. *Nutr Rev.*, v.54, n.3, p.91-93, Mar., 1996.

XUE, C. et al. Consumption of medium- and long-chain triacylglycerols decreases body fat and blood triglyceride in Chinese hypertriglyceridemic subjects. *Eur J Clin Nutr.*, v.63, n.7, p.879-886, July, 2009.

YOUNES-RAPOZO, V. et al. Early weaning is associated with higher neuropeptide Y (NPY) and lower cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in paraventricular nucleus (PVN) at adulthood. *Br J Nutr.*, v.108, p.2286-2295, Dec., 2012.

YOUNES-RAPOZO, V. et al. Neonatal Nicotine Exposure Leads to Hypothalamic Gliosis in Adult Overweight Rats. *J Neuroendocrinol.*, v.27, n.12, p.887-898, Dec., 2015.

ZHAO, M.; CHEN, X. Eicosapentaenoic acid promotes thermogenic and fatty acid storage capacity in mouse subcutaneous adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.450, n.4, p.1446-1451, Aug., 2014.