



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Vanessa da Silva Tavares Rodrigues**

**Consequências do aleitamento complementar com leite de vaca para o  
desenvolvimento de ratos e ratas Wistar**

Rio de Janeiro

2017

Vanessa da Silva Tavares Rodrigues

**Consequências do aleitamento complementar com leite de vaca para o desenvolvimento  
de ratos e ratas Wistar**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Patricia Cristina Lisboa

Coorientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elaine de Oliveira

Rio de Janeiro

2017

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

R696 Rodrigues, Vanessa da Silva Tavares

Consequências do aleitamento complementar com leite de vaca para o desenvolvimento de ratos e ratas wistar / Vanessa da Silva Tavares Rodrigues – 2017. 105 f.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Patricia Cristina Lisboa  
Coorientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elaine de Oliveira

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

1. Amamentação – Teses. 2. Lactentes - Desmame – Teses. 3. Lactentes-Nutrição – Teses. 4. Ratos Wistar – Teses. 5. Suplementação alimentar. 6. Síndrome X metabólica. I. Lisboa, Patricia Cristina. II. Oliveira, Elaine de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 618.63

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB7/5302

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

---

Assinatura

---

Data

Vanessa da Silva Tavares Rodrigues

**Consequências do aleitamento complementar com leite de vaca para o desenvolvimento  
de ratos e ratas wistar**

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

Aprovada em 13 de março de 2017.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Patricia Cristina Lisboa  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Elaine de Oliveira  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Andrea Claudia Freitas Ferreira  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Simone Vargas da Silva  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2017

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ter sido fiel e me abençoado em todos os momentos. Ao meu marido Elvis por ter sido muito paciente, amoroso e ter me dado muita força nos momentos em que eu tive pequenos surtos. E aos meus pais (Silvio e Maria Jorgina) e irmã (Érica) que sempre estiveram do meu lado me apoiando em tudo.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar ao meu lado, por ter aberto as portas para novas oportunidades e ter me colocado onde estou agora.

Depois as minhas orientadoras, Patrícia Lisboa e Elaine de Oliveira. Não tenho palavras para agradecer a força que vocês me deram no desenvolver do trabalho e principalmente nesse finalzinho, onde tive vários problemas pré defesa (choros, desespero, travamento, tudo aconteceu!!), mas vocês conseguiram me colocar novamente no prumo, muito obrigada por tudo.

Ao professor Egberto que sempre apoiou o meu projeto, dando várias idéias e sempre ensinando e incentivando nas buscas por novidades.

Ao meu marido, amor da minha vida, companheiro, que sempre está disposto a encarar todas as minhas idéias, me dá força, cuida da minha alimentação (kkk) e está sempre comigo.

Aos meus pais, que mesmo possuindo educação básica sempre fizeram de tudo para eu estudar e assim alcançar degraus cada vez mais altos.

A minha irmã que mesmo depois de brigas é minha eterna companheira.

A Dayse e Thamara, que me aguentam desde a graduação, me ajudaram a dar leite aos meus bichinhos, suportaram meu nervosismo nos problemas de biotério e sacrifício. Obrigada pela amizade de vcs!!!

A Janaine e Patricia que se tornaram minha servas (amo vocês!!!), muito obrigada pela ajuda nessa reta final, sem vocês não teria braços para fazer tudo o que tinha que fazer.

A todas as meninas do lab (Camila, Luciana, Thamara, Vivi, Fernanda, Fabiele, Nayara, Janaine, Deysla, Bia, Dayse, Patricia, Tatianne) que sempre me ajudaram em tudo o que precisei, sendo amigas, dando força, discutindo na hora do almoço, rindo, chorando, algumas tentando me embriagar (kkk), mas está valendo, amo todas vocês. Formamos uma família linda!!!

Também agradeço aos alunos de iniciação científica e os funcionários do departamento que estão sempre dispostos a ajudar.

Muito obrigada por tudo!!!!

A mente que se abre a uma nova idéia,  
jamais voltará ao seu tamanho original.

*Albert Einstein*

## RESUMO

RODRIGUES, Vanessa da S. Tavares. *Consequências do aleitamento complementar com leite de vaca para o desenvolvimento de ratos e ratas wistar*. 2017.105 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Em humanos, a alimentação complementar deve ser iniciada após 6 meses; A introdução de qualquer alimento ou água antes desse tempo é considerada desmame precoce, o que está associado a problemas de saúde na idade adulta. O leite de vaca é um alimento comumente introduzido na alimentação de crianças menores de 6 meses de idade, com uma composição nutricional inadequada, principalmente devido a uma pior relação de caseína: proteína de soro de leite em comparação com o leite humano. Nós hipotetizamos que ratos lactantes alimentados com leite de vaca, que é rico em proteínas e peptídeos bioativos, desenvolvem disfunções metabólicas tardias. Do dia pós-natal (PN) 14 a 20, os ratos lactantes foram divididos em 3 grupos: Leite de rato (RM), no qual filhotes receberam leite de rato por via oral em uma seringa; Leite de vaca (CM), em que filhotes receberam leite de vaca; E CM enriquecido com caseína (CM-H), em que filhotes receberam CM com o dobro da quantidade de proteína como leite de rata. A prole foi sacrificada em PN21 e em PN180. Em PN21, os machos CM apresentaram menor adiposidade visceral em comparação com outros grupos. A corticosteronemia foi maior em machos CM-H, apesar de não apresentar nenhuma alteração no metabolismo de glicocorticóides no fígado e no tecido adiposo visceral. Em PN180, as fêmeas CM e CM-H apresentaram maiores depósitos de gordura e hiperfagia, embora não houvesse alteração na leptina e na sinalização de leptina no hipotálamo. As fêmeas CM-H tiveram uma tendência de hipoinsulinemia e uma diminuição significativa no HOMA- $\beta$ , sugerindo menor secreção de insulina. Os machos do grupo CM-H apenas apresentaram redução da proteína corporal. Os machos CM apresentaram hipercorticosteronemia associada a menor expressão de  $11\beta$ HSD1 no tecido adiposo visceral. Em conclusão, a introdução precoce de leite de vaca em ratos recém-nascidos causou alterações gênero-dependentes de nos parâmetros metabólicos e endócrinos em curto e longo prazo.

Palavras-chave: Leite de vaca. Programação. Obesidade. Corticosterona. Dimorfismo.



## ABSTRACT

RODRIGUES, Vanessa da S. Tavares. *Consequences of supplementary suckling with cow's milk for development of males and females rats Wistar*. 2017. 105 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

In humans, complementary feeding should be started after 6 months; the introduction of any food or water before this time is considered early weaning, which is associated with health problems in adulthood. Cow's milk is a common food introduced to children less than 6 months that has an inadequate nutritional composition, mainly due to a worse casein: whey protein ratio compared to human milk. We hypothesized that suckling rats fed with cow's milk, which is rich in protein and bioactive peptides, develop further metabolic dysfunction. From postnatal day (PN) 14 to 20, Wistar rat pups were divided into 3 groups: rat milk (RM), in which pups received rat milk orally in a syringe; cow's milk (CM), in which pups received cow's milk; and CM with high protein (CM-H), in which pups received CM with twice the amount of protein as rat milk. Pups were killed on PN21 and PN180. At PN21, CM males had lower visceral fat mass compared with other groups. Serum corticosterone was higher in CM-H males, despite no change in glucocorticoid metabolism in liver and visceral fat. At PN180, CM and CM-H females had greater fat depots and hyperphagia, although there was no alteration in leptinemia and leptin signaling in the hypothalamus. CM-H females had a trend of hypoinsulinemia and a significant decrease in HOMA- $\beta$ , suggesting lower insulin secretion. Males from the CM-H group had only lower total body protein mass. CM males had hypercorticosteronemia associated with lower expression of 11 $\beta$ HSD1 in visceral fat. In conclusion, early introduction of cow's milk in neonate rats leads to gender-dependent differences in metabolic and endocrine parameters in the short- and long-term.

Keywords: Cow's milk. Programming. Obesity. Corticosterone. Sex dimorphism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – % do risco relativo de mortalidade e infecções de crianças não amamentadas comparada a crianças amamentadas exclusivamente de 0-5 meses .....	21
Figura 2 – Duração legal da licença maternidade, 2013 (185 países e territórios).....	25
Figura 3 – Micela de caseína.....	31
Figura 4 – Classificação da obesidade quanto ao local de deposição da gordura.....	42
Figura 5 – Síntese, metabolismo e ação da vitamina D.....	48
Figura 6 – Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA).....	48
Figura 7 – Linha do tempo experimental.....	55
Figura 8 – Perfil eletroforético das proteínas do leite.....	63
Figura 9 – Evolução da massa corporal e do comprimento de ratos desmamados precocemente durante a lactação.....	64
Figura 10 - Massa corporal e evolução do comprimento de ratos precocemente desmamados após o período de desmame.....	68
Figura 11 - Ingestão alimentar acumulada da prole precocemente desmamada.....	69
Figura 12 - Área dos adipócitos viscerais de fêmeas adultas que foram desmamadas precocemente.....	71
Figura 13 - Área dos adipócitos viscerais de fêmeas adultas que foram desmamadas precocemente.....	72
Figura 14 - Via de sinalização da leptina no núcleo arqueado do hipotálamo nas proles adultas que foram desmamadas precocemente em ambos os sexos.....	75
Figura 15 - Enzima de conversão e receptor de glicocorticoide das proles desmamadas precocemente em PN21.....	77
Figura 16 - Enzima de conversão e receptor de glicocorticoide das proles desmamadas precocemente em PN180.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Orientações alimentares para lactantes nos primeiros séculos depois de Cristo.....	21
Tabela 2 – Comparação entre a composição do leite materno, fórmula infantil e leite de vaca integral.....	27
Tabela 3 – Comparação entre a composição do leite de diferentes espécies.....	29
Tabela 4 – Distribuição da caseína no leite de vaca e humano.....	32
Tabela 5 – Resumo dos PBAs codificados dentro das proteínas do leite bovino.....	39
Tabela 6 – Classificação de obesidade segundo IMC (para adultos) e risco para o desenvolvimento de comorbidades.....	42
Tabela 7 – Composição do leite.....	62
Tabela 8 – Composição corporal de ratos precocemente desmamados durante a lactação.....	65
Tabela 9 – Perfil Lipídico durante a lactação.....	66
Tabela 10 – Homeostase glicêmica e perfil hormonal durante a lactação.....	67
Tabela 11 – Composição corporal pela ressonância magnética nuclear de ratos adultos.....	69
Tabela 12 – Massa de gordura visceral e composição corporal pelo método da carcaça em ratos adultos.....	70
Tabela 13 – Perfil Lipídico na vida adulta.....	73
Tabela 14 – Homeostase glicêmica e perfil hormonal na vida adulta.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 $\beta$ HSD-1	11-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1
1,25(OH) <sub>2</sub> D	1,25 dihidroxivitamina D ou calcitriol
25(OH)D	25-hidroxivitamina D ou calcidiol
3T3-L1	Linhagem celular de fibroblastos diferenciada em adipócito
AAP	American Academy of Pediatrics
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Akt	Proteína quinase B
AM	Aleitamento materno
AMC	Aleitamento materno complementado
AME	Aleitamento materno exclusivo
AMm	Aleitamento materno misto ou parcial
AMP	Aleitamento materno predominante
ARA	Ácido araquidônico
CEI-12	Sequência de aminoácidos (Phe-Phe-Val-Ala-ProPhe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys)
CEI-6	Sequência de aminoácidos (Thr-ThrMet-Pro-Leu-Trp)
CEI-7	Sequência de aminoácidos (Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg)
CLT	Consolidação das Leis do Trabalho
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DHA	Ácido docosahexaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EUA	Estados Unidos da America
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAS	Ácido graxo sintase
FOXO1	Proteína O1 da caixa de Forkhead
GH	Hormônio do crescimento
GLUT	Transportador de glicose
GMP	Glicomacropéptídeo

GR $\alpha$	Receptor de glicocorticóides alfa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HOMA- $\beta$	Modelo de Avaliação da Homeostase – capacidade funcional de células beta
HOMA- IR	Modelo de Avaliação da Homeostase – índice de resistência a insulina
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HTLV	Vírus linfotrópico da célula T humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IGF1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IGF1-R	Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IGFBP3	Proteína ligadora dos fatores de crescimento semelhante a insulina
IGF-II	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IkK/ikKB	Quinase iKB
IL-10	Interleucina tipo 10
IL-4	Interleucina tipo 4
IL-5	Interleucina tipo 5
IL-8	Interleucina tipo 8
IMC	Índice de massa corporal
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato de receptor de insulina
IRS 1	Substrato de receptor de insulina 1
IRS 2	Substrato de receptor de insulina 2
JAK2	Janus quinase 2
JNK	Quinases N- terminais
LCPUFA	Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante

LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Quinase ativada por mitogénio
MKP	Sequência de aminoácidos (Met-Lys-Pro)
mTOR	Alvo mecanicista da rapamicina
MUFA	Ácido graxo monoinsaturado
NBCAL	Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes
NCD-RisC	NCD Risk Factor Collaboration
NF-kB	Fator nuclear kB
ObRb	Receptores da leptina
OIT	Organização Internacional do Trabalho
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBAs	Peptídeos bioativos
PCR	reação de polimerase em cadeia
PDK1	Proteína quinase-1 dependente de fosfoinositois
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
pJAK2	Janus quinase 2 fosforilada
PKB	Proteína kinase B
PN	Pós-natal
PNIAM	Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno
POMC	Pro-opiomelanocortina
PPAR	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma
PPAR $\alpha$	Receptor ativado por poliferador de peroxissoma alfa
PPAR $\beta$	Receptor ativado por poliferador de peroxissoma beta
PPAR $\delta$	Receptor ativado por poliferador de peroxissoma delta
PPAR $\gamma$	Receptor ativado por poliferador de peroxissoma gama
PTH	Paratormônio
PVN	Núcleo paraventricular
QEPVL	Sequência de aminoácidos (Gln-Glu-Pro-Val-Leu)
S6K1	Proteína ribossomal quinase S6 beta-1
SBAN	Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição
SIRT1	Sirtuina 1
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição

TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
VDR	Receptor de vitamina D

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
1.1	Aleitamento materno .....	18
1.2	Desmame precoce .....	19
1.3	Substitutos do leite materno .....	24
1.4	Composição nutricional do leite .....	28
1.4.1	Carboidrato .....	29
1.4.2	Lipídeo .....	29
1.4.3	Proteína .....	30
1.4.3.1	Caseína .....	31
1.4.3.2	Proteínas do soro .....	32
1.4.4	Minerais e vitaminas .....	33
1.5	Peptídeos bioativos (PBAs) das proteínas do leite bovino .....	34
1.5.1	Atividade anti-hipertensiva .....	34
1.5.2	Atividade imunomoduladora .....	35
1.5.3	Atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica e antitrombótica .....	35
1.5.4	Favorecimento da absorção de minerais .....	36
1.5.5	Atividade opióide .....	36
1.6	Programação metabólica ou plasticidade ontogenética .....	40
1.7	Obesidade .....	41
1.7.1	Leptina .....	44
1.7.2	Insulina .....	45
1.7.3	IGF-1 .....	45
1.7.4	Vitamina D .....	46
1.7.5	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) .....	47
1.8	Justificativa .....	48
1.9	Hipótese .....	50
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	51
2.1	Objetivo geral .....	51
2.2	Objetivos específicos .....	51



3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	52
3.1	Banco de leite de rata .....	52
3.2	Composição do leite .....	52
3.3	Perfil eletroforético das proteínas do leite .....	53
3.4	Modelo experimental da introdução do leite de vaca em ratos durante a lactação .....	54
3.5	Eutanásia .....	55
3.6	Composição corporal - ressonância magnética nuclear (RMN) .....	56
3.7	Composição corporal - método de carcaça .....	56
3.8	Análise morfológica de adipócitos .....	57
3.9	Análise de hormônio sérico - ensaio imunoenzimático (ELISA), radioensaio (RIE) e ensaio eletroquimioluminescente (ECLIA) ....	57
3.10	Análise bioquímica .....	58
3.11	Medição de sensibilidade à glicemia e insulina .....	58
3.12	Dissecção do punch .....	59
3.13	Western Blot .....	59
3.14	Reação em cadeia da polimerase e transcriptase reversa (RT-PCR) .....	60
3.15	Análise estatística .....	61
4	<b>RESULTADOS</b> .....	62
4.1	Composição do leite e perfil eletroforético das proteínas do leite .....	62
4.2	Mudanças na prole durante a amamentação .....	64
4.3	Mudanças na prole no período pós-desmame .....	67
4.4	Alterações moleculares .....	74
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	79
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	87
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	88

## INTRODUÇÃO

De acordo com a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2001), a alimentação complementar deve ser iniciada somente a partir dos 6 meses de vida; antes desse período, recomenda-se o aleitamento materno exclusivo (AME), ou seja, sem a introdução de nenhum outro alimento, nem mesmo água. A introdução de alimentos antes do sexto mês de vida é prejudicial, pois está relacionado com infecções, problemas gastrointestinais, problemas nas vias respiratórias, alterações na função renal, desnutrição e obesidade (BRASIL, Ministério da Saúde - 2005). A média mundial do AME é de 37%, mas o objetivo da OMS é aumentar essa média, até 2025, para 50% (OMS, 2014). A baixa adesão do AME, constitui um grande problema na saúde pública, pois afeta a saúde e a economia, uma vez que este hábito evitaria a morte de cerca de 800.000 crianças (menores de 2 anos) e o mundo economizaria 300 bilhões de dólares com tratamento dos problemas causados pelo desmame precoce (Victora et al., 2016). No Brasil, apenas 41% das crianças com menos de 6 meses são amamentadas exclusivamente (BRASIL, Ministério da Saúde - 2009; OMS, 2010).

Em nosso país, o leite de vaca é amplamente utilizado como substituto ou complemento do leite materno, principalmente devido ao seu baixo custo (Junqueira et al., 2008; Bortolini et al., 2013; Cavalcanti et al, 2015). O leite de vaca não é recomendado para crianças menores de 6 meses de vida, devido a sua composição nutricional inadequada ao crescimento e desenvolvimento de um lactente. Este, apresenta quantidades insuficientes de carboidratos, de ácidos graxos essenciais, de vitaminas e minerais, além de alta quantidade de proteína com inadequada relação entre caseína, 80% e proteínas do soro, 20% (Bortolini et al, 2013; Lara-villoslada et al, 2005) comparada ao leite humano que tem uma relação de 40% de caseína para 60% de proteínas do soro (Wada et al., 2017).

Estudos em humanos sugerem que a alta ingestão de proteínas no primeiro ano de vida, principalmente as de origem láctea, está relacionada ao sobrepeso na infância e até mesmo na idade adulta (Koletzko et al, 2009; Günther et al, 2007; Hörnell et al, 2013<sup>b</sup>). Essa mudança no padrão de alimentação dos bebês pode estar agindo como fator de *imprinting*, causando uma programação metabólica, que é definida por mudanças nutricionais, hormonais e / ou ambientais em períodos críticos de vida (gestação e/ou lactação) com potencial para causar modificações epigenéticas durante o desenvolvimento, podendo gerar alterações estruturais e funcionais prejudiciais à saúde, aumentando o risco de doença na idade adulta,

como obesidade e diabetes (De Moura et al., 2008; Portha et al., 2014; Panchenko et al., 2015).

Quanto ao desmame precoce, nosso grupo de pesquisa há algum tempo vem trabalhando com dois modelos experimentais (farmacológico e não farmacológico) caracterizados pela redução do aporte de leite materno. Ambos os modelos de desmame precoce programam a prole para sobrepeso, maior adiposidade visceral, hiperleptinemia e resistência à insulina (De Moura et al., 2009, Lima et al., 2011). Assim, decidimos desenvolver outro modelo de desmame precoce através da introdução de leite de vaca (enriquecido ou não com caseína) e, dessa forma, testar a hipótese de que o consumo de leite de vaca e/ou o excesso de proteína no início da vida pode levar a alterações metabólicas imediatas e futuras. Assim, o modelo atual consiste na introdução de uma mamadeira com leite de vaca, no terço final da lactação para complementar o aleitamento materno em roedores da linhagem Wistar. Para responder a nossa pergunta experimental, utilizamos 3 grupos experimentais:

1º) grupo LEITE DE RATA - recebeu leite de rata (grupo controle);

2º) grupo LEITE DE VACA - recebeu leite de vaca, no entanto, como esse leite possui menos proteína que o leite de rata, esse grupo recebeu um leite hipoproteico;

3º) grupo LEITE DE VACA (hiperproteico) - recebeu leite de vaca acrescido de caseína (o dobro de proteína que o leite de rata possui), para atingir o excesso de proteína que ocorre na complementação com leite de vaca para humanos.

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Aleitamento materno

Aleitamento materno é a forma mais natural e econômica para nutrir o neonato, sendo um processo que envolve fatores fisiológicos, ambientais e emocionais. É um ato que se difere da lactação por sua complexidade, uma vez que a lactação engloba apenas os aspectos fisiológicos, marcado por ação hormonal (Vitolo, 2008).

Hoje em dia, já está mais do que comprovado os benefícios do leite materno em detrimento de outros tipos de leite. De acordo com a revisão da American Academy of Pediatrics - AAP (2005), o aleitamento materno reduz o número de infecções respiratórias, gastrointestinais, do trato urinário, diarreia, enterocolite, otite média, morte súbita, diabetes, alguns tipos de câncer, sobrepeso, hipercolesterolemia e asma. Outros estudos mostram que crianças amamentadas ao seio apresentam melhor desenvolvimento cognitivo, quando comparadas a crianças desmamadas (Horwood et al, 2001; Reynolds, 2001). Além de benefícios para o bebê, o aleitamento materno protege a mãe contra o câncer de mama; alguns tipos de câncer de ovário; fraturas ósseas; morte por artrite reumatóide; e contribui para amenorréia após o parto (Dewey et al., 1997; Labbok, 2001; Jakobsson et al., 2003; Victora et al., 2016).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o aleitamento materno é classificado em 5 tipos (OMS, 2007):

- Aleitamento materno exclusivo (AME) - quando a criança recebe apenas leite materno;
- Aleitamento materno (AM) - quando a criança recebe leite materno, independente de receber outros alimentos;
- Aleitamento materno predominante (AMP) - quando além do leite materno, a criança recebe água, sucos ou chás;
- Aleitamento materno complementado (AMC) - quando além do leite materno, a criança recebe qualquer alimento sólido ou semi-sólido, com o intuito de complementá-lo ou substituí-lo;

- Aleitamento materno misto ou parcial (AMm) - quando além do leite materno, a criança recebe outros tipos de leite.

Atualmente a média mundial de AME está em torno de 37%, porém a OMS tem como objetivo aumentar esse percentual para 50% até 2025. Para isso, seria necessário um aumento anual de 2,3%, o que resultaria em cerca de 10 milhões de crianças a mais sendo amamentada exclusivamente até o sexto mês de vida. Segundo a OMS, em 10 anos (1985-1995) as taxas de AME no mundo passaram de 14% para 38%, no entanto, após esse grande crescimento, os índices voltaram a cair em algumas regiões (OMS, 2014). O Brasil, de acordo com a II pesquisa de prevalência de aleitamento materno, realizada pelo Ministério da Saúde, apresentou um índice de 41% das crianças em AME, ficando atrás de países como o Camboja (60%), Peru (63%) e Bolívia (54%), e na frente de outros países como, Mali (38%), Indonésia (32%) e Nigéria (17%) (BRASIL, Ministério da Saúde – 2009; OMS, 2010).

A baixa aderência ao AME, constitui um grande problema de saúde pública. Um estudo recentemente publicado revelou que a universalização do AME evitaria cerca de 800.000 mortes de crianças com menos de 2 anos de idade, que corresponde a 13,8% do total de mortes nesta faixa etária, além de prevenir a morte de 20.000 mulheres por câncer de mama (Victora et al, 2016). O aumento nas taxas do AME não afetaria apenas a qualidade de saúde da população, mas teria também um importante impacto econômico. De acordo com Rollins (2016), se o mundo alcançasse 90% de AME, por exemplo, os Estados Unidos deixariam de gastar US\$ 2,45 bilhões, a China US\$ 223 milhões e o Brasil US\$ 6 milhões. No mundo, essa economia poderia chegar a US\$ 300 bilhões, de forma que reduzindo os gastos com tratamentos de saúde, estes poderiam ser investidos para outros fins como o desenvolvimento dos países. Assim, fica clara a importância de se promover o AME, pois se traduz em saúde para mãe e bebê, redução de custos com tratamentos de saúde e economia para os cofres públicos.

## 1.2 Desmame precoce

Instituições de saúde nacionais e internacionais como a OMS, Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e Ministério da Saúde do Brasil, recomendam o AME até o sexto mês de vida do bebê, pois como vimos anteriormente, esse ato está diretamente

relacionado tanto a benefícios a saúde, como também econômicos. A introdução de qualquer outro tipo de alimento, até mesmo água, durante os seis primeiros meses de vida, é classificado como desmame precoce (BRASIL, Ministério da Saúde -1986; UNICEF Brasil; OMS 2001).

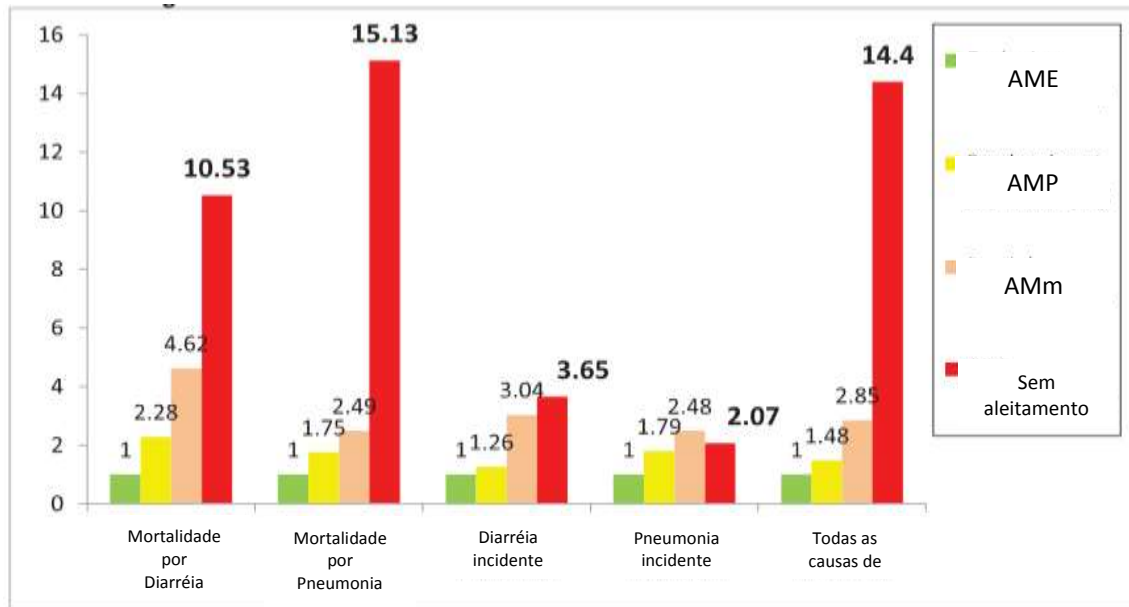
Embora o AME seja considerado uma boa estratégia de promoção de saúde e tenha um grande apelo das instituições de saúde, sua adesão ainda é baixa e o desmame precoce é uma realidade, constituindo um grande desafio a ser enfrentado.

Desde o século passado é observado um aumento nos índices de desmame precoce, o que resultou na morte de milhões de bebês por diarreia, problemas respiratórios e desnutrição (BRASIL, Ministério da Saúde - 2010). O desmame precoce está sendo relacionado a diversos problemas de saúde de curto prazo como (figura 1): infecções (gastrointestinais, respiratórias e urinárias) (Victora et al, 1987; Arifeen et al, 2001; Mårild et al, 2004) . Além disso, está associado ao desenvolvimento de excesso de peso em longo prazo (Harder et al, 2005; Oddy et al , 2014).

Em mamíferos, é fácil de entender que a alimentação no início da vida consista de leite, e que cada filhote mame o leite de sua mãe. Porém, desde as primeiras civilizações, textos e imagens mostram que não é bem assim que vem ocorrendo, pois a amamentação sempre foi algo muito influenciado por costumes sociais, mitos e credos (Castilho e Barros Filho, 2010).

Sorano e Galeno, médicos gregos que atuaram entre os anos 70-130 e 130-200 d.C., respectivamente, já faziam orientações alimentares aos lactantes (tabela 1).

Figura 1 - % do risco relativo de mortalidade e infecções de crianças não amamentadas comparada a crianças amamentadas exclusivamente de 0-5 meses.



Fonte: UNICEF 2011

Tabela 1 - Orientações alimentares para lactantes nos primeiros séculos depois de Cristo.

Prescrição	Sorano (70-130 d.C.)	Galeno (130-200 d.C.)
1º alimento	Mel + leite de vaca	Mel
Início do aleitamento	2º dia - ama, 20º dia - mãe	-
Aleitamento (mãe ou ama)	Mãe, ama (se necessário)	Mãe
Técnica	Desprezar o colostro	-
Quantidade	Frequente	-
Início da introdução de alimentos	A partir do 40º dia; preferencialmente após 6 meses	Após o 1º dente
Alimento complementar	Cereal, pão + leite ou vinho, mingau, ovo; pré-mastigado ou não	Pão, vegetais, carne e leite
Vinho	Diluído	Contra-indicado
Desmame	18-24 meses, de forma gradual	3 anos

Fonte: Fildes, 1986 apud Castilho e Barros Filho 2010.

No Brasil, a cultura do desmame ocorre com a chegada da corte portuguesa ao país, em que as mulheres ricas com hábitos europeus não achavam necessário amamentar por varias questões, como beleza/estética, e então faziam uso das amas de leite (Eny e Nascimento, 2001). As amas de leite constituem uma parte da história da amamentação e mostra o quanto esta é influenciada por modificações sociais. As amas de leite sempre estiveram presentes nas sociedades, porém, a sua utilização ocorria em caso de morte e/ou doença da mãe e a partir do século XVII somente as mulheres ricas utilizavam desse artifício. No século XVIII, mulheres de todos os extratos sociais passaram a utilizar as amas de leite. Esse foi o início da substituição de leite, pois mesmo sendo leite humano, o bebê utilizava o leite de outra mãe. Nessa mesma época, muitos bebês morreram por se contaminar com doenças contraídas das amas e também devido à prática que elas criaram de dar leite de vaca em pequenos chifres para as crianças, um esboço das atuais mamadeiras. O sistema das amas de leite no Brasil prosperou até aproximadamente o século XIX. Após esse período, as amas de leite foram substituídas pelas mamadeiras com leite de vaca (Machado, 1999).

As mamadeiras constituem outro símbolo do desmame precoce. Elas surgiram no período da revolução industrial, na Europa no século XVIII e no Brasil no século XIX. Esse evento pode ser considerado um divisor de águas na questão do desmame precoce, pois levou a introdução maciça das mulheres ao mercado de trabalho, gerando assim uma modificação no estilo de vida feminino, que se mantém até hoje, mulheres fortemente inseridas no mercado de trabalho (Vinagre et al, 2001; Castilho e Barros Filho, 2010).). Neste período que as indústrias perceberam a necessidade da produção de alimentos alternativos ao leite materno para as mães que trabalhavam. O leite de vaca por possuir um teor elevado de proteína, foi considerado um alimento ideal para suprir as necessidades nutricionais dos bebês (Ângelo, 2014). Em 1853 foi lançado um leite condensado (leite de vaca desnatado, adoçado e condensado), esse leite não precisava de refrigeração e foi visto pelas mães como a grande solução para a questão da amamentação (UNICEF, 1981). A partir desse leite condensado, em 1867, Henri Nestlé desenvolve a “Farine Lactée” uma mistura de leite de vaca, farinha de trigo e açúcar (BRASIL, Ministério da Saúde 2009; Almeida e Novak, 2004). Em 1911, em algumas partes do mundo, iniciou-se o processo de produção de leite em pó, técnica que chegou ao Brasil em 1918 (Ângelo, 2014).

Visto que os leites desenvolvidos na época não estavam sendo benéficos para o desenvolvimento dos bebês, laboratórios farmacêuticos iniciaram as elaborações das fórmulas lácteas e, em meados dos anos 20, os laboratórios como "Wyeth" e "Ross" (hoje "Abbott-Ross"), iniciaram sua comercialização nos EUA. Em 1929, o laboratório Mead-Johnson,



lançou a primeira fórmula a base de soja (Rea, 1990). Assim, a união da mamadeira, um símbolo da industrialização, com o leite industrializado, configurou uma solução para a questão “amamentação” para as mães que trabalham, favorecendo o desmame precoce.

Toda essa história sobre a amamentação ajuda a compreender a origem dos pensamentos e das práticas das mulheres, ao serem mães, em relação ao aleitamento. As causas do desmame precoce são multifatoriais e estão intimamente relacionadas ao contexto psíquico-social em que a mãe está inserida. Estudos apontam como principais causas: a cultura da mamadeira, mitos sobre a amamentação (leite fraco, queda dos seios, etc.), falta de informação dos profissionais de saúde sobre a importância do aleitamento materno, e a indústria de propaganda e marketing sobre a diversidade de substitutos do leite materno (Eny e Nascimento, 2001).

O elevado índice de desmame precoce, a produção e propagandas de substitutos do leite materno e o número de mortes infantis impulsionaram os órgãos de saúde a criarem normas de proteção e incentivo ao aleitamento materno. Em maio de 1981, a UNICEF realizou uma Assembleia Mundial de Saúde que aprovou o “Código Internacional de Comercialização de Substitutos do Leite Materno” (UNICEF, 1981). No mesmo ano, o Brasil lançou o PNIAM - Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (BRASIL. Ministério da Saúde - 1993), porém, apenas em 1988 foi aprovado no Brasil, a Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes (NBCAL -1988). Essa norma sofreu várias modificações, no intuito de ser mais eficaz e hoje é denominada “Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes e Crianças de Primeira Infância, Bicos, Chupetas e Mamadeiras” (NBCAL - 2001), sendo internacionalmente considerada uma iniciativa de proteção, promoção e apoio ao aleitamento materno.

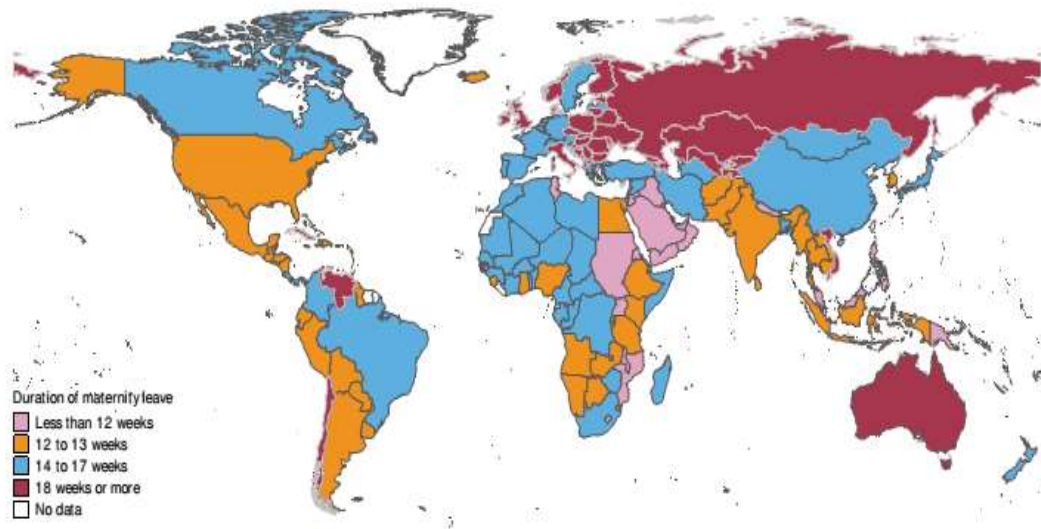
Além das normas citadas acima, o Brasil possui uma legislação avançada com relação a proteção, promoção e apoio ao aleitamento materno. A Constituição Federal garante à mulher que trabalha fora do lar, 120 dias de licença maternidade, tempo inferior ao recomendado pela OMS para a realização do AME. Com o intuito de aumentar esse tempo e chegar a recomendação da OMS, o governo federal criou a Lei 11.770, publicada em 9 de setembro de 2008, que prorroga a licença-maternidade para até 6 meses, mediante concessão de incentivos fiscais às empresas. Além disso, a Consolidação das Leis do Trabalho (CLT) assegura o direito à creche para que as mulheres possam amamentar seus filhos, assim como dois descansos de 30 minutos cada, para a mulher amamentar no seu horário de trabalho (BRASIL. Ministério da Saúde - 2010). No entanto, essas leis não abrangem uma grande parte de mulheres que estão no mercado de trabalho de maneira informal ou autônoma.

Segundo um estudo realizado pela Organização Internacional do Trabalho - OIT (Addati et al, 2014), apenas 34 países, incluindo o Brasil, seguem a sua recomendação de oferecer pelo menos 14 semanas (3,3 meses) de licença maternidade. De acordo com esse estudo, os maiores tempos de licença maternidade ocorrem na Europa (figura 2), onde os países oferecem 18 semanas ou mais. Enquanto isto, países pobres oferecem um tempo muito mais curto; por exemplo, no oriente médio a licença maternidade é menor que 12 semanas. Um ponto que chama bastante atenção é que os Estados Unidos da América, uma grande potência econômica, oferecem apenas 3 meses de licença, e a mulher que se afasta não recebe nenhuma remuneração. Esses dados mostram que as organizações mundiais estão incentivando cada vez mais o aleitamento materno.

### **1.3 Substituto do leite materno**

Atualmente os órgãos de saúde não recomendam a utilização de substitutos, sendo porém recomendados somente em algumas situações específicas, como: filhos de mães portadoras do vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), vírus T-linfotrófico humano (HTLV), mães usuárias de drogas, criança portadora de galactosemia, leucínose e fenilcetonúria, Doença de Chagas, se a mãe apresentar varicela, infecção hepática, vírus do herpes com lesões abertas na mamas, estiver em uso de algumas medicações e abscesso mamário (BRASIL, Ministério da Saúde -2009; OMS, 2009).

Figura 2 - Duração legal da licença maternidade, 2013 (185 países e territórios).



Fonte: banco de dados da Organização Internacional do Trabalho (OIT) 2014.

No caso de impossibilidade do uso do leite materno, o mercado oferece alguns tipos de substitutos: as fórmulas infantis (láctea e vegetal – a base de soja) e o leite integral de vaca. Dentre eles, o que mais se aproxima do leite humano são as fórmulas infantis lácteas, porém o seu consumo é limitado a uma pequena parte da população devido o seu elevado preço. A fórmula a base de soja só é recomendada para bebês com galactosemia, com alguma intolerância e/ou alergia a algum componente do leite de vaca, ou por questões culturais/religiosas. Já o leite de vaca integral, como o leite de qualquer outro mamífero, não é um substituto adequado para o leite materno (OMS, 2009<sup>b</sup>).

As fórmulas infantis lácteas são feitas a partir do leite da vaca, que sofre várias modificações e adições para torná-lo o mais adequado possível e assim ser capaz de suprir todas as necessidades do lactente. São classificadas em: de **prematuros** - desenvolvidas para crianças pré termo, considerando sua capacidade gástrica restrita; de **partida** - que satisfaz as necessidades de crianças com menos de 6 meses; e a de **seguimento** - para crianças maiores de seis meses. Atualmente existem vários tipos de fórmulas, cada uma, desenvolvida para suprir necessidades específicas dos bebês: sem lactose, hipoalergênicas; anti-refluxo, oligoméricas, elementares, entre outras. Essa classificação e os tipos também são encontrados nas fórmulas a base de soja. As formulações mais modernas contam com a suplementação de ácidos graxos docosahexaenóico (DHA) e ácido araquidônico (ARA) e probióticos, tornando as fórmulas mais semelhantes ao leite materno (Health Canadá).

O leite de vaca não é recomendado para crianças menores de 6 meses de vida, devido a sua composição nutricional inadequada ao crescimento e desenvolvimento de um lactente (tabela 2). Este apresenta quantidades insuficientes de carboidratos, de ácidos graxos essenciais, de vitaminas e minerais, além de uma elevada quantidade de proteína com inadequada relação entre caseína 80% e proteínas do soro 20% (Lara-villoslada et al, 2005; Cavalcanti et al, 2015) comparada ao leite humano que tem uma relação de 40% de caseína para 60% de proteínas do soro (Wada et al, 2017).

O consumo precoce de leite de vaca está relacionado a uma série de problemas de saúde, como: anemia, (pelo consumo de alimentos pobres em ferro e/ou pela perda de sangue oculto nas fezes), alergias, desenvolvimento de diabetes tipo I, sobrecarga renal, além de deficiência de vitaminas e ácidos graxos essenciais (Monte e Giugliani, 2004; Turck, 2013).

Na literatura internacional, poucos estudos são encontrados sobre a prevalência do consumo de leite de vaca por crianças menores de seis meses, apesar de existirem muitos dados abordando fórmulas infantis, o que não é o foco desse trabalho. Porém, um estudo realizado com bebês do Tibete, mostrou que o leite de vaca está entre os 4 primeiros alimentos ofertados para crianças menores de 6 meses, como substituto ou complemento do leite materno (Dang et al, 2005). No Brasil, sabe-se que o leite de vaca é a primeira opção para substituir ou complementar o leite materno (Junqueira et al., 2008; Bortolini et al., 2013; Cavalcanti et al, 2015).

Mesmo sendo nutricionalmente inadequado e trazendo vários malefícios à saúde das crianças menores de 6 meses, o leite de vaca ainda é bastante utilizado. Estudos apontam que alguns fatores como, pouca idade e baixa escolaridade da mãe e a renda da família, são capazes de influenciar a prevalência do consumo precoce do leite de vaca (Cavalcanti et al, 2015). Esse último, é o fator que prepondera sobre os outros devido aos altos preços das fórmulas infantis no Brasil, uma vez que manter a alimentação de uma criança nos primeiros 6 meses de vida pode ultrapassar o valor de um salário mínimo, apenas com as fórmulas, sem considerar as mamadeiras e os bicos (Barbosa et al, 2007).

Tabela 2 - Comparação entre a composição do leite materno, fórmula infantil e leite de vaca integral.

	LEITE HUMANO			Fórmula infantil*		LEITE DE VACA
	C	T	M	Leite de Partida	Leite de Seguimento	
Água (g/dl)	87,2	86,4	87,6	-	-	87,3
Energia (kcal/dl)	58	74	71	60 - 70	60 - 70	69
Carboidrato (g/dl)	5,3	6,6	7	9,0 - 14	9,0 - 14	4,8
Gorduras (g/dl)	1,85-2,9	2,9-3,6	3,0-3,8	4,4 - 6	4 - 6	3,7
Proteínas totais(g/dl)	2,7	1,6	1,2	1,8 - 3,0	1,8 - 3,5	3,3
<b>Minerais</b>						
Sódio (mEq/l)	21	13	7	20 - 60 <sup>#</sup>	20 - 60 <sup>#</sup>	25
Potássio (mEq/l)	19	16	14	60 - 180 <sup>#</sup>	60 - 180 <sup>#</sup>	35
Cloreto (mEq/l)	26	15	12	50 - 160 <sup>#</sup>	50 - 160 <sup>#</sup>	29
Cálcio (mg/dl)	31 - 32	29 - 34	28 - 33	50	50	125
Magnésio (mg/dl)	3 - 4	2,7 - 4	3 - 4	5	5	12
Fósforo (mg/dl)	12 - 14	15 - 17	13 - 15	25	25	96
Sulfato (mg/dl)	22	20	14			30
Ferro (mg/dl)	0,09	0,04	0,15	0,45 - 1,3	0,9 - 2	0,1
Iodo (mg/dl)	0,012	0,002	0,007	10	10	0,021
Cobre (mg/dl)	0,05	0,05	0,04	35	35	0,03
Zinco (mg/dl)	0,5-0,96	0,32-0,46	0,25-0,37	0,5	0,5	0,38
<b>Vitaminas</b>						
Vitamina A (ug/dl)	161	88	53	60 - 180	60 - 180	34
Vitamina E (mg/dl)	1,5	0,68	0,46	0,5	0,5	-
Vitamina K (ug/dl)	-	-	1,5	4	4	6,0
Vitamina C (mg/dl)	7,2	7,1	4,3	10	10	1,8
Niacina (ug/dl)	-	-	172	300	300	85

Vitamina B6 (ug/dl)	1,7	3,5	11	35	35	48
Ácido Fólico (ug/dl)	-	-	4 - 5	10	10	5
Vitamina B12 (ug/dl)	0,05	-	0,18	0,1	0,1	0,56
Tiamina (ug/dl)	1,9	5,9	16	-	-	42
Riboflavina (ug/dl)	30,2	36,9	43	-	-	157

Legenda: \*Valores retirados da RDC nº 43 da ANVISA de 19/09/2011

\*Todos os valores estão expressos por 100Kcal de produto pronto, as faixas são recomendações mínimas e máximas.

# Valoresexpressos em mg/100 Kcal.

C = Colostro/ T = transição / M = maduro

Fonte: Adaptado de Calil et al, 1992 e RDC nº 43 da ANVISA, 2011.

#### 1.4 Composição nutricional do leite

O leite é um líquido esbranquiçado produzido pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos. Sendo o alimento mais completo nutricionalmente, contendo todos os nutrientes necessários para sustentar a vida do recém-nascido. Os tipos de leite variam de acordo com a espécie e raça e, entre os indivíduos da mesma raça, saúde, peso, fatores alimentares, número de parto, estágio da lactação e estação do ano (tabela 3). Os leites de vaca, cabra e ovelha representam cerca de 87% da produção mundial de leite (Medhammar et al, 2012).

O leite de vaca é um alimento que por séculos faz parte da alimentação humana. Ele é uma das principais fontes de energia, proteína e gordura da dieta, configurando um alimento de alto valor nutricional. Talvez, por essas características, anos atrás tenha sido escolhido, como alimento ideal para substituir o leite humano. Porém, quando o comparamos ao leite humano, observamos importantes diferenças entre os dois tipos de leite.

Tabela 3 - Comparação entre a composição do leite de diferentes espécies.

	<i>Gordura</i>	<i>Proteína</i>	<i>Lactose</i>	<i>Minerais</i>
	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>Humano</b>	<b>4,5</b>	<b>1,1</b>	<b>6,8</b>	<b>0,2</b>
<b>Vaca</b>	<b>4,5</b>	<b>3,6</b>	<b>4,9</b>	<b>0,7</b>
<b>Rata</b>	<b>14,8</b>	<b>11,3</b>	<b>2,9</b>	<b>1,5</b>
Jumenta	1,2	1,7	6,9	0,45
Égua	1,6	2,7	6,1	0,51
Cabra	3,5	3,1	4,6	0,79
Porca	8,2	5,8	4,8	0,63
Elefanta	15,1	4,9	3,4	0,76
Baleia	34,8	13,6	1,8	1,6
Gambá	6,1	9,2	3,2	1,6

Fonte: Modificado de Jenness, 1986.

#### 1.4.1 Carboidratos

O principal presente no leite é a lactose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e outra de galactose.

A lactose exerce papel importante na síntese do leite por ser o seu principal componente osmótico; no processo de síntese do leite, ela atrai água para as células epiteliais mamárias. Devido a grande relação da lactose e a síntese do leite, esse é o componente que apresenta menor variação. Quando comparado ao leite humano, observamos quantidade inferior de lactose no leite de vaca (redução de aproximadamente 31%). Fisiologicamente, contribui para melhor absorção intestinal de cálcio e fósforo, como também para a utilização da vitamina D pelo organismo (Buzinaro et al, 2006; SBAN, 2015).

#### 1.4.2 Lipídeos

A gordura do leite é o componente mais variável, sofre influencia da nutrição e de condições ambientais. Além de fornecer energia, transporta vitaminas lipossolúveis. A fração

lipídica do leite é composta basicamente de triglicerídeos (98%), diacilglicerol (2%), colesterol (<0,5%), fosfolípidios (~1%) e ácidos graxos livres (0,1%). O conteúdo de gordura do leite de vaca não difere do leite humano, porém, a qualidade se diferencia de forma consistente (SBAN, 2015).

O leite de vaca apresenta maior quantidade de ácido graxo saturado que corresponde a 70% do conteúdo total lipídico, dos quais 40% são ácido láurico (C12:0) e palmítico (C16:0). Possui elevado conteúdo de ácido esteárico (C18:0) e do ácido graxo monoinsaturado (MUFA), o ácido oléico (C18:1 $\omega$ 9). Também apresenta uma pequena quantidade de gorduras trans (ácido linoléico conjugado - CLA) provenientes dos processos metabólicos dos intestinos dos ruminantes. Já o leite humano possui ácido linoléico (C18:2  $\omega$ 6) e linolênico (C18:3  $\omega$ 3), que são ácidos graxos essenciais, precursores dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFA– ácido araquidônico-AA e ácido docosahexaenóico-DHA), ácidos graxos essenciais para o desenvolvimento neurológico dos lactentes (Calil e Falcão, 2003; FAO, 2013).

#### 1.4.3 Proteínas

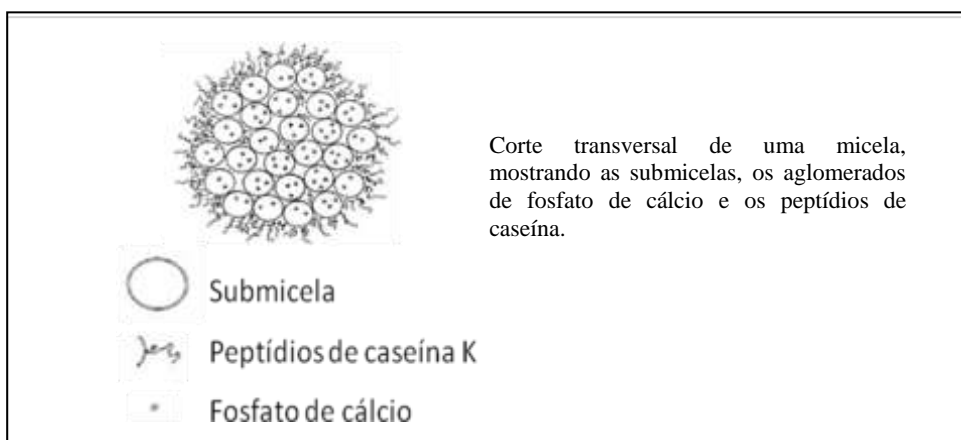
O leite de vaca é considerado um alimento fonte de proteínas, devido a sua quantidade e alto valor biológico, devido ao bom equilíbrio entre os aminoácidos essenciais, incluindo a lisina. Possui duas frações classificadas de acordo com a sua solubilidade, a insolúvel, representada pela caseína e a fração solúvel, representada pelas proteínas presente no soro do leite ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, glicomacropéptídeos). No leite de vaca, a relação entre caseína e proteína do soro é de 80:20. Já o leite humano possui uma relação 40:60 de caseína/proteína do soro, o que confere a ele melhor digestibilidade (Calil e Falcão, 2003; Sgarbieri, 2005; Vitolo, 2008).



### 1.4.3.1 Caseína

É uma fosfoproteína com atividade anfipática, pouco solúvel em água, encontrada no leite em formas de micelas. As micelas são formadas por caseína e fosfato de cálcio, sendo responsáveis pela cor branca do leite (figura 3).

Figura 3 - Micela de caseína.



Fonte: Sgarbieri, 2005.

As micelas de caseína têm a função de fornecer aminoácidos, cálcio e fosfato; esse transporte é muito eficiente e estudos mostram correlação positiva entre os conteúdos lácteos do cálcio e fósforo com o teor de caseína (Calil e Falcão, 2003).

As caseínas são classificadas em 4 grupos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  e  $\gamma$ . A caseína  $\alpha$ , apresenta algumas variantes e constitui uma família de proteínas com características diferentes ( $\alpha S0$  -  $\alpha S5$ ) (tabela 4).

Com relação a diferença entre leite de vaca e humano, é observado que no leite humano a fração predominante é a  $\beta$ -caseína, mais suscetível a hidrólise peptídica, e as micelas são pequenas, o que favorece a formação de coalhos, gerados pela precipitação da caseínas mais frágeis. Essas características reduzem o tempo de esvaziamento gástrico e contribuem para uma maior digestibilidade do leite humano, diferente do que ocorre com o leite de vaca (Calil e Falcão, 2003; FAO, 2013).

Tabela 4 - Distribuição da caseína no leite de vaca e humano.

Caseína (g/L)	Leite bovino	Leite humano
Caseínas Totais	26,0	3,2
$\alpha$ -S <sub>1</sub>	10,0	-
$\alpha$ -S <sub>2</sub>	2,6	-
B	9,3	2,2
K	3,3	1,0
$\Gamma$	0,8	-

Fonte: Sgarbieri 2005.

#### 1.4.3.2 Proteína do soro

Apresentam excelente composição de aminoácidos, com ótima biodisponibilidade e digestibilidade.

$\beta$ -lactoglobulina: É a proteína do soro que se apresenta em maior quantidade no leite de vaca. Não é encontrada no leite humano. Atua no metabolismo do retinol e dos ácidos graxos; possível efeito antioxidante e anti-hipertensivo (SBAN, 2015). Essa é a proteína mais relacionada a alergias e intolerâncias em humanos (Sgarbieri, 2005).

$\alpha$ -lactoalbumina: É a proteína presente em maior quantidade no leite humano. Favorece a absorção intestinal de cálcio e zinco; potenciais efeitos imunoreguladores, anticarcinogênicos e anti-hipertensivos (SBAN, 2015). Na glândula mamária é necessária para a síntese de lactose, pois modifica a D-glicose 4- $\beta$ -galactosiltransferase, enzima chave para a síntese de lactose (Calil e Falcão, 2003; Sgarbieri, 2005). Por ser rica em triptofano, pode auxiliar a síntese de serotonina (Citraro et al, 2011)

Imunoglobulinas: IgA, IgM, IgE e IgG atuam na proteção imunológica (SBAN, 2015).

Albumina sérica: Fornece aminoácidos para o organismo e é precursora de peptídeos bioativos (Spadoti e Moreno, 2008).

Glicomacropéptido (GMP): Efeito antiviral e bifidogênico (SBAN, 2015)

Lactoferrina: Glicoproteína com grande afinidade pelo ferro que se liga ao mineral e impede que microrganismos patogênicos o utilizem para seu metabolismo, conferindo-lhe ação bacteriostática (Calil e Falcão, 2003; Hill e Newburg, 2015). Age como fator de crescimento e maturação dos enterócitos (Sgarbieri, 2005).

Lactoperoxidase: Enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio, na presença de um doador de hidrogênio ou de um componente oxidável. E também funciona como inibidora de bactéria (Sgarbieri, 2005).

Lisozima: Tem a função de romper a parede celular bacteriana. Sua atuação sinérgica com a lactoferrina e IgA confere a ela poder bactericida contra a maioria das bactérias Gram positivas e algumas negativas.

#### 1.4.4 Minerais e vitaminas

O leite de vaca possui cerca de 3 vezes mais minerais que o leite humano, o que pode levar a desequilíbrios hidroeletrolíticos e ácido-básico em recém nascidos, além de contribuir para um aumento da atividade renal devido a carga de soluto (Calil et al, 1992).

No entanto, o leite de vaca é pobre em ferro, um dos motivos pelo qual o leite de vaca não é recomendado para crianças menores de 1 ano. A sua utilização está altamente associada com a anemia ferropriva (FAO, 2013).

As vitaminas presentes no leite de vaca em sua maioria estão em maior quantidade, porém ao ser processado, se torna carente das vitaminas que não resistem a altas temperaturas, como a vitamina C e o ácido fólico (Calil et al, 1992; SBAN, 2015).

## 1.5 Peptídeos bioativos (PBAs) das proteínas do leite

As proteínas ao serem digeridas no trato gastrointestinal (hidrólise enzimática e fermentação bacteriana) liberam peptídeos com atividades biológicas (bioativos). No início de sua descoberta eles foram definidos como componentes liberados pelos alimentos com atividade reguladora no organismo, depois foram descritos como fragmentos específicos de proteínas com impacto positivo nas funções corpóreas, e por fim como peptídeos com atividade similar a drogas ou hormônios com o possível papel de modular as funções fisiológicas do organismo. Os PBAs possuem de 3 a 20 resíduos de aminoácidos por molécula e, normalmente, são inativos dentro da sequência da molécula (Spadoti e Moreno, 2008).

Os PBAs podem afetar vários sistemas: cardiovascular, digestivo, imune e nervoso (Baum et al, 2013), trazendo benefícios ou malefícios a saúde, exercendo atividades anti-hipertensiva, imunomodulatória, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antitrombótica, favorecendo a absorção de vitaminas e minerais, e opióide (Tabela 5) (Sipola et al, 2002<sup>b</sup>, Teschemacher, 2003; SBAN, 2015; Hill e Newburg, 2015).

### 1.5.1 Atividade anti-hipertensiva

A atividade anti-hipertensiva de peptídeos liberados pela caseína tem sido descrita há algum tempo. A liberação desses peptídeos ocorrem de duas formas: hidrólise enzimática ou fermentação bacteriana (Majumde e Wu, 2014).

Os primeiros peptídeos a serem descritos com atividade anti-hipertensiva foram derivados da  $\alpha_{S1}$ -caseína CEI-12 (Phe-Phe-Val-Ala-ProPhe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys), CEI-6 (Thr-ThrMet-Pro-Leu-Trp), e um da  $\beta$ -caseína CEI-7 (Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg). A administração de 100mg/kg de peso destes peptídeos em ratos espontaneamente hipertensos reduziu a pressão arterial sistólica e a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática (Karaki et al, 1990). Um outro estudo, também utilizando peptídeos derivados da  $\alpha_{S1}$ -caseína, na dose 4, 6 e 7 mg / Kg de peso também mostrou a capacidade de reduzir a pressão arterial diastólica e sistólica (Miguel et al, 2010). Yamada et al (2013), descobriram um novo peptídeo, o MKP, e observou que ele foi capaz de reduzir a atividade da ECA.

A  $\alpha$ -lactoalbumina, também possui peptídeos com atividade anti-hipertensiva, atuando como inibidora da ECA (Miguel et al, 2010).

### 1.5.2 Atividade imunomoduladora

Jiehui et al (2014) mostraram que a utilização por via oral de um PBA (Gln-Glu-Pro-Val-Leu (QEPVL) derivado da caseína, extraído do leite fermentado, reduziu a inflamação causada por LPS, regulando a liberação de óxido nítrico e a produção das citocinas IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , além de ativar linfócitos. Um outro estudo que avaliou o perfil de citocinas de humanos saudáveis após o consumo de leite fermentado por kefir, observou aumento de IL5 com consequente estímulo de IgA na mucosa gastrointestinal e redução de IL8, que pode controlar a resposta inflamatória suprimindo a quimiotaxia e ativação de neutrófilos (Adiloğlu et al, 2013), o autor atribuiu esses efeitos aos PBAs. Além de regular as citocinas, estudos tem mostrado que a hidrolisados de  $\alpha$ s1 e  $\beta$  caseína estimularam a atividade dos macrófagos contra glóbulos vermelhos “in vitro” (Parker et al. 1984), além de estimular sua atividade fagocítica dos macrófagos em camundongos infectados por *Klebsiella* (Migliore-Samour et al. 1989).

### 1.5.3 Atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica e antitrombótica

A função antimicrobiana da lactoferrina já é bem conhecida, no entanto um estudo mostrou que os efeitos do PBA liberado após hidrólise com pepsina suína, foi muito mais efetiva, pois inibiu o crescimento espécies de Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo estirpes que eram resistentes à lactoferrina íntegra (Tomita et al, 1991). Um estudo “in vitro”, mostrou que após a hidrólise enzimática da  $\alpha$ -lactalbumina bovina, três PBAs com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus lentus*, foram liberados (Pellegrini et al, 1999). Kanwar et al (2009) mostraram o efeito antifúngico tanto da lactoferrina íntegra como de peptídeos liberados após sua hidrólise contra *Candida albicans* e *Candida crusei*. Nesse mesmo estudo também foi demonstrado atividade antiviral da lactoferrina e seus PBAs derivados, contra o *Herpes simplex*.

A casoplatelina é um peptídeo derivado da  $\kappa$ -caseína e inibe a agregação plaquetária. Seus principais peptídeos estão nas sequências 106-116 (Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys) e em pequenos fragmentos (106-112, 112-116, 113-116) (Meisel, 2005).

#### 1.5.4 Favorecimento da absorção de minerais

Os peptídeos com essa função são chamados de caseinofosfopeptídeos e são liberados a partir da hidrólise da  $\alpha_s1$ -,  $\alpha_s2$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína. Devido a alta concentração de cargas negativas nesses peptídeos, se ligam de modo eficiente em cátions divalentes, tornando-se um ótimo carreador de Fe, Mn, Cu e Se. Eles são referidos por melhorar a absorção de  $Ca^{+2}$  no intestino delgado (Hayes et al, 2007). Apresentam grande utilidade na indústria alimentícia, fortificando alimentos com baixo conteúdo mineral (Meisel, 1997).

#### 1.5.5 Atividade opióide

Peptídeos com atividade opióide apresentam função farmacológica semelhante a morfina (oriunda do ópio). O sistema opióide é formado por receptores, peptídeos opióides endógenos e exógenos. Os receptores são  $\mu$  (responsável por comportamento emocional, peristaltismo ou motilidade intestinal),  $\delta$  (responsável pela sedação, analgesia e ingestão alimentar) ou  $\kappa$  (responsável pelo comportamento emocional) (Hayes et al, 2007). Os principais peptídeos opióides endógenos são:  $\beta$ -endorfina – derivado do pro-opiomelanocortina (POMC); Encefalina – derivado da preproencefalina A; e Dinorfina – derivado da pré-proencefalina B. Os peptídeos opióides exógenos, podem ser sintéticos ou derivado da hidrólise de algumas proteínas. Esses peptídeos podem apresentar atividades agonista e antagonista; possuem especificidade para um determinado receptor, porém, podem se ligar a mais de um tipo de receptor e exercer sua atividade (Fichna et al, 2007).

O leite de vaca apresenta peptídeos opióides, denominados exorfina, que são derivados tanto das proteínas do soro ( $\alpha$ -lactorfina,  $\beta$ -lactorfina, lactoferroxina, serorfina) quanto da caseína (casomorfina e casoxicina). Esses peptídeos se ligam aos receptores do sistema opióide endógenos e exercem atividades agonista ou antagonista, e sua atividade afeta

vários sistemas do organismo como: digestório, cardiovascular, nervoso e endócrino (Teschemacher, 2003).

A grande maioria das exorfinas, derivadas das proteínas do leite, possuem mais afinidade pelo receptor  $\mu$ , mas também se ligam aos outros receptores; a grande parte deles atua como agonista (Meisel, 2004). A primeira exorfina identificada foi a  $\beta$ -casomorfina, derivada da  $\beta$ -caseína bovina e é o peptídeo mais estudado (Wada e Lönnnerdal, 2013).

Estudos em humanos e em animais mostraram os efeitos destes peptídeos tanto após a administração do peptídeo isolado como após a ingestão de leite de vaca e/ou hidrolisado de caseína. Um efeito que é amplamente estudado é o controle do trato gastrointestinal; alguns estudos observaram efeito antidiarreico e redução do trânsito intestinal após o consumo de  $\beta$ -casomorfina em animais e humanos (Daniel et al, 1990; Teschemacher et al, 1986).

No sistema cardiovascular, as casomorfina reduzem a pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (Sipola et al, 2002<sup>a</sup>; Contreras et al, 2009). No sistema nervoso central, foi visto melhora (dose baixa) ou piora (dose alta) no quadro de amnésia, dependendo da dose de  $\beta$ -casomorfina 5, administrada intra-cerebroventricular em camundongos (Sakaguchi et al, 2003). No estudo realizado por Lin et al (1988), a administração intra-cerebroventricular e periférica de  $\beta$ -casomorfina 7 aumentou a ingestão alimentar de ratos.

Esses peptídeos também atuam no sistema endócrino. Estudos mostraram que os opióides em humanos e animais estimulam a secreção de GH e prolactina, reduzem LH, testosterona, estradiol e oxitocina (Kato et al, 1978; Bhansali et al, 2005; Johnson et al, 1993; Katz e Mazer et al, 2009; Yilmaz e Gilmore, 1999). Já os níveis de TSH de humanos e roedores apresentam perfis divergentes, enquanto aumentam em humanos, diminuem em roedores. Com relação a vasopressina e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) os dados convergem. Schusdziarra et al (1983) viram que a administração intra-gástrica de hidrolisado de caseína estimulou a liberação de insulina e somatostatina em cães, e em outro estudo foi observado a inibição da secreção de LH em ovelhas que beberam leite de vaca na lactação (Lozano et al, 1998).

Para que esses peptídeos possam se ligar em seus receptores e exercer qualquer tipo de função fora do trato gastrointestinal, seus precursores (proteínas) precisam ser hidrolisados e os peptídeos liberados devem chegar a corrente sanguínea. Entretanto, estudos realizados em humanos e ratos adultos saudáveis, não conseguiram identificar esses peptídeos na corrente sanguínea após a ingestão de leite (Teschemacher et al, 1986). Contudo em estudos com lactentes, foi observada a presença das casomorfina no plasma após a ingestão de leite de vaca (Sun et al, 2003). A condição sugerida para presença das casomorfina no plasma de

filhotes é devido a imaturidade do trato gastrointestinal, principalmente da mucosa intestinal, que favorece a passagem desses PBAs (Teschemacher, 2003). De fato, indivíduos adultos com doenças como esquizofrenia, autismo e psicose pós parto, que sabidamente afetam a microbiota intestinal causando inflamação e aumentando a permeabilidade intestinal, apresentam uma grande quantidade de casomorfina no sangue e na urina (Cade et al, 2000).

Assim, a mudança no padrão alimentar no início da vida através do consumo de leite de vaca por lactentes, além de causar todos os problemas de saúde anteriormente mencionados, pode estar relacionado a disfunções ainda mais profundas na primeira infância, podendo impactar na vida adulta.



Tabela 5 - Resumo dos PBAs codificados dentro das proteínas do leite bovino.

<b>Proteína precursora</b>	<b>Nome do PBA</b>	<b>Fragmento</b>	<b>Bioatividade</b>
<b><math>\alpha_{s1}</math> - caseína</b>	Casoquinina-5	f (23-27)	Inibidor da ECA 2
	Caseínofosfopeptídeo	f (43-58) 2P	
	Caseínofosfopeptídeo	f (59-79) 4P	Transporte de
	Caseínofosfopeptídeo	f (66 -73) 3P	minerais
	Imunocasoquinina	f (194-199)	Imunomoduladora
	$\alpha$ -caseína exorfina	f (90-96)	Agonista Opióide
	Casoxina D	f (158-164)	Antagonista Opióide
<b><math>\beta</math>-caseína</b>	$\beta$ -casoquinina 7	f (177-183)	Inibidor da ECA 2
	$\beta$ -casoquinina	f (193-202)	Imunomodulador
	Cosomorfina 5	f (60-64)	Agonista Opióide
	Cosomorfina 7	f (60-66)	Agonista Opióide e imunomodulador
	Cosomorfina 11	f (60-70)	Agonista Opióide
	Caseínofosfopeptídeo	f (1-25)	Transporte de minerais e imunomodulador
	Imunopeptídeo	f (191-193)	Imunomodulador
<b><math>\kappa</math> -caseína</b>	Casopletina	f (106-116)	Antitrombótico
	Peptídeo Inibidor da trombina	f (112-116)	Antitrombótico
	Casoxina C	f (25-34)	Antagonista Opióide
	Casoxina 6	f (33-38)	Antagonista Opióide
<b><math>\alpha</math>-lactoalbumina</b>	Imunopeptídeo	f (18-20)	Imunomodulador
	$\alpha$ -lactorfina	f (50-53)	Agonista Opióide
<b><math>\beta</math>-lactoglobulina</b>	$\beta$ -lactorfina	f (102-105)	Agonista Opióide
<b>Soroalbumina</b>	Serorfina	f (399-404)	Agonista Opióide
<b>Lactoferrina</b>	Lactoferricina B	f (17-41)	Imunomodulador e antimicrobiano
	Peptídeo inibidordatrombina	f (39-42)	Antitrombótico
	Lactoferroxina A	f (318-323)	Antagonista Opióide
	Lactoferroxina B	f (536-540)	Antagonista Opióide

Lactoferroxina C	f (673-679)	Antagonista Opióide (?)
------------------	-------------	----------------------------

Legenda: ECA – enzima conversora de angiotensina

? – não está totalmente esclarecido

Fonte: adaptado de Teschemacher 2003; Shah 2000; Meisel 2005.

## 1.6 Programação metabólica ou plasticidade ontogenética

A programação metabólica é um evento epigenético que ocorre devido a alterações nutricionais, hormonais e ambientais em períodos críticos da vida (gestação, lactação e adolescência) que funcionam como fator de “imprinting” podendo levar à mudanças metabólicas imediatas e tardias (De Moura et al, 2008). Atualmente o termo utilizado para denominar esse fenômeno é plasticidade ontogenética, devido a suas características probabilísticas (Gluckman e Hanson, 2007). O modo como estes insultos afetam o organismo e causam doenças ainda não está completamente elucidado, porém sabe-se que alterações fenotípicas que ocorrem não são em decorrência das modificações na sequência de DNA, mas sim devido aos padrões de metilação do DNA e acetilação/metilação de histonas, que levam a estimulação ou supressão de determinados genes, culminando em doenças (Panchenko et al, 2015).

O primeiro estudo que relacionou injúrias no início da vida com o desenvolvimento de doenças na vida adulta foi desenvolvido por Barker (1993), e foi de onde surgiu a hipótese da programação metabólica. Depois disso, vários trabalhos epidemiológicos, clínicos e experimentais vêm confirmando essa hipótese (Stanner et al, 1997; Bonomo et al, 2005; Symonds et al, 2009; Santos-Silva et al, 2010)

As modificações no padrão alimentar dos lactentes podem agir como fator de imprinting, prejudicando o desenvolvimento sadio e gerando, no futuro, respostas fisiológicas inadequadas (Ravelli et al, 1976). Um dos grandes problemas de saúde no mundo associado a programação metabólica é o desenvolvimento de obesidade e suas comorbidades.

Nesta perspectiva, nosso grupo vem trabalhando há algum tempo com dois modelos de desmame precoce, um farmacológico e outro não farmacológico, onde os filhotes são privados do leite materno nos últimos 3 dias de amamentação. O modelo farmacológico utiliza a bromocriptina, um agonista do receptor dopaminérgico de tipo 2 que inibe a secreção de prolactina. Nesse estudo, os animais desmamados apresentaram, quando adultos,

obesidade, dislipidemia, hiperleptinemia, resistência à insulina, hipotireoidismo e altas concentrações de hormônios adrenais (Bonomo et al, 2007; Bonomo et al 2008; De Moura et al, 2009). No modelo não-farmacológico, onde as mães são enfaixadas com uma bandagem para impedir o acesso dos filhotes as tetas também foi observado nas proles adultas, obesidade, hipertrigliceridemia, hiperleptinemia, resistência à insulina e aumento de catecolaminas adrenais (Lima et al, 2011; Lima et al, 2013).

Alguns trabalhos na literatura consideram o consumo de leite de vaca e/ou excesso de proteína no início da vida como fator de imprinting, pois este pode modular os níveis séricos de insulina e IGF1 (Hoppe et al, 2004; Hoppe et al, 2005). O consumo de leite de vaca por crianças ou adultos gera um aumento sérico de IGF1 (Heaney et al, 1999; Cadogan et al 1997), efeito este que tem sido atribuído as proteínas lácteas, principalmente a caseína, que estimulam a síntese de IGF1 e IGF1BP3 (Hoppe et al, 2009)

## 1.7 Obesidade

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, resultando em problemas de saúde, que normalmente é gerado pelo balanço energético positivo, causado pelo desequilíbrio entre consumo e gasto energético (U.S. 2001). É uma doença de etiologia multifatorial e complexa, envolvendo fatores genéticos, ambientais e comportamentais (ABESO, 2009).

Esta pode ser classificada pela quantidade de gordura, avaliada normalmente pelo índice de massa corporal ( $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura}^2 \text{ (m)}$ ) (ABESO, 2009) (Tabela 6), e pela localização do depósito de gordura, avaliada pela deposição na região abdominal (andróide) e deposição de forma uniforme pela periferia (ginóide) (OMS, 2000) (Figura 4). A obesidade andróide representa maior risco cardiometabólico.

É mundialmente considerada um problema de saúde pública, atingindo praticamente todos os países do mundo, todas as classes sociais e todas as faixas etárias (ABESO, 2009). Atualmente no mundo existem cerca de 2 bilhões de pessoas com sobrepeso ou obesidade. Segundo a pesquisa realizada pela associação internacional para o estudo da obesidade, até 2025 cerca de 2,7 bilhões de pessoas estarão obesos ou com sobrepeso em todo mundo, o que corresponde acerca de 37% da população mundial (World Obesity Federation, 2015). No Brasil, cerca de 52,5% dos adultos estão com sobrepeso e 17,9% com obesidade; esses valores

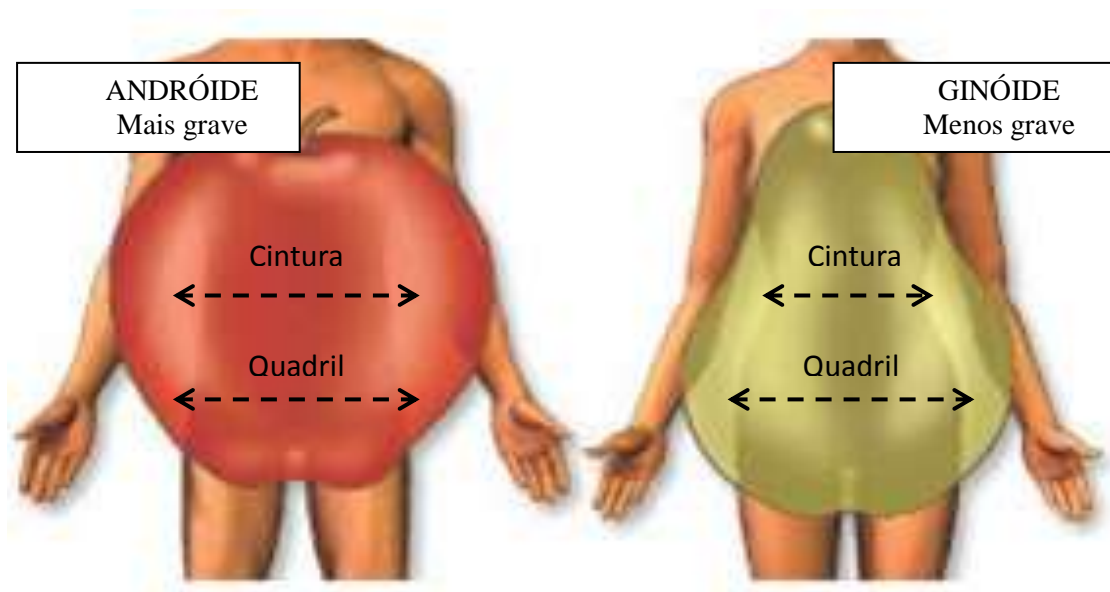
apresentaram um aumento substancial no intervalo de 2006-2014, o sobrepeso subiu em 23% e a obesidade em 50% (Vigitel, 2014), mostrando a necessidade de políticas preventivas urgentes.

Tabela 6 - Classificação de obesidade segundo IMC (para adultos) e risco para o desenvolvimento de comorbidades.

Classificação	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Risco de comorbidades
Baixo peso	< 18,5	Baixo (risco aumentado para outros problemas clínicos)
Eutrófico	18,5 – 24,9	Baixo
Pré-obeso	25 – 29,9	Aumentado
Obesidade I	30 – 34,9	Moderado
Obesidade II	35 – 39,9	Grave
Obesidade III	> 40	Muito grave

Fonte: OMS 2000

Figura 4 - Classificação da obesidade quanto ao local de deposição da gordura.



Fonte: adaptado de Malbrain et al, 2014

Esses números, são bem alarmantes, pois a obesidade e o sobrepeso, estão associados a uma série de doenças que geram um enorme gasto com tratamentos. De acordo com a World Obesity Federation, o custo com tratamentos de doenças relacionadas a obesidade em países desenvolvidos varia de 2% a 8% do gasto total com atenção a saúde. Nos EUA em 2008, cerca de 147 bilhões de dólares foram gastos com tratamento médicos para a obesidade (World Obesity Federation, 2015).

O sobrepeso e obesidade afetam a saúde de forma bastante expressiva, reduzindo de forma significativa a qualidade de vida, pois desencadeiam condições debilitantes, como: osteoartrite, dificuldades respiratórias, problemas músculo-esquelético e problemas psicológicos (depressão, distúrbios alimentares, imagem corporal distorcida e baixa auto-estima). Além de doenças crônicas não transmissíveis: diabetes tipo 2, hipercolesterolemia, hipertensão arterial, cardiopatias, disfunções hormonais e alguns tipos de câncer (Pisunyer, 1991; OMS 2000; ABESO, 2009; Markey et al, 2016; Courties et al, 2017)

Muito dos problemas de saúde, citados no parágrafo anterior, tem íntima relação com as alterações causadas no tecido adiposo em decorrência da obesidade. O tecido adiposo, principalmente o visceral que é considerado mais metabolicamente ativo, é um órgão endócrino que deixou de ser visto apenas como um compartimento para deposição de gordura. Ele passou a ser considerado um tecido endócrino, pois produz e libera uma série de citocinas e hormônios que possuem ação autócrina, parácrina e endócrina, além de possuir uma série de receptores para uma grande variedade de hormônios. Essas características do tecido adiposo permitem que ele interaja com outros órgãos (Kuryszko et al, 2016). Desde a década de 90, a obesidade foi reconhecida como uma doença inflamatória e desde então estudos mostraram que o aumento de peso trazia junto o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e angiotensinogênio e redução de citocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina (Bullo et al, 2007).

Uma das grandes questões da obesidade é a adipogênese, e o papel dos PPARs (receptores activados por proliferador de peroxissoma) tem sido bastante estudado. Os PPARs são sensores lipídicos que modulam, a nível transcripcional o metabolismo em resposta a fatores nutricionais. Existem três tipos de PPAR:  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ , que possuem padrões de distribuição tecidual distinto e exercem funções específicas em cada tecido. O PPAR $\gamma$  é o mais potente e também é reconhecido como obrigatório no processo de diferenciação de adipócitos. Atualmente ele tem se tornado alvo de terapias para o controle de desordens relacionada a obesidade (Farmer, 2005; Barquissau et al, 2016; Gross et al, 2017).

Na obesidade, os processos de síntese, secreção, transporte e/ou resposta a alguns hormônios podem estar alterados, principalmente envolvendo a leptina, a insulina, o IGF1, a vitamina D e o eixo HPA.

### 1.7.1 Leptina

A leptina é um hormônio secretado principalmente pelo tecido adiposo branco, descoberta em 1994, que regula a homeostase energética e funções neuroendócrinas e imunológicas. Seus níveis séricos são diretamente proporcionais a quantidade de tecido adiposo (Klok et al, 2007). Sua atividade como reguladora da homeostase energética ocorre no hipotálamo, principalmente no núcleo arqueado, onde inibe neurônios orexígenos e estimula neurônios anorexígenos, dessa forma reduzindo a ingestão alimentar (Abella et al, 2017).

Sua função é exercida através da ligação do hormônio ao seu receptor ObRb, na qual ocorre a ativação de múltiplas cascatas de sinalização, como: Janus quinase 2 / transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK2/STAT3), quinase ativada por mitogénio / quinase regulada por sinal extracelular (MAPK / ERK) e fosfatidilinositol 3 quinase / proteína quinase B (PI3K / Akt) (Thon et al, 2016).

Na obesidade, apesar da hiperleptinemia, não há redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético, quadro denominado resistência a leptina (Bjorbaek et al, 1999). Essa resistência pode ser periférica e/ou central e está relacionada com alterações no transporte deste hormônio pela barreira hematoencefálica e na sua via de sinalização (Golden et al, 1997). Esta última envolve modificações/defeitos no receptor (OBR-b) ou na alteração na expressão das proteínas da via de sinalização pós-receptor (Mori et al, 2004). Porém o mecanismo da resistência a leptina não está totalmente elucidado e vem sendo relacionado a inúmeros fatores, como a inflamação hipotalâmica, estresse de retículo endoplasmático e atividade da SIRT1 (Ibars et al, 2017).

### 1.7.2 Insulina

A insulina é um hormônio pancreático que tem como principal função o controle do metabolismo e da homeostase glicêmica, através da estimulação da captação de glicose pelos tecidos periféricos, como gordura, fígado e músculo esquelético. Além disso, ela regula o desenvolvimento tecidual através da ativação de vias mitogênicas. A insulina também regula a ingestão alimentar e o gasto energético através da sua ação no sistema nervoso central (Obici et al, 2002; Cederquist et al, 2017).

A via de sinalização da insulina é iniciada através da sua ligação na subunidade alfa do seu receptor (IR), que é uma proteína com atividade tirosina-quinase, e essa ligação estimula a fosforilação de substratos de receptor de insulina (IRS) e promove a ativação da via PI3K-Akt, que é a principal via metabólica da insulina (Thon et al, 2016).

Existe uma correlação positiva entre o aumento da adiposidade visceral e a resistência à insulina (Lo et al, 2013). O mecanismo para o desenvolvimento de resistência a insulina relacionado a obesidade envolve alterações em sua via de sinalização, podendo ser a nível de receptor ou pós receptor, atrapalhando a transdução do sinal, acarretando na redução da atividade quinase do receptor de insulina, da fosforilação do IRS 1 e 2, da PI3K, o que resulta na redução da migração do GLUT para a membrana celular (Emanuelli et al, 2000). Além disto, o excesso de citocinas inflamatórias e de nutrientes, típico da obesidade, podem ativar vias inflamatórias, como JNK (c-jun N-terminal kinase), IkK/ikKB/NF-kB (nuclear fator kB) e mTOR (mammalian target of rapamycin)/S6K1 (p70 S6 kinase 1), que também inibem a sinalização da insulina resultando na resistência a insulina (Freitas et al, 2014).

### 1.7.3 IGF-1

É um fator de crescimento semelhante à insulina que possui 70% de homologia com a insulina. O IGF1 é produzido por quase todos os tecidos, porém o órgão que contribui para o nível sérico é o fígado. Estimula o crescimento através da ativação de vias de diferenciação e proliferação celular nos tecidos (Martinelli et al, 2008).

Estudos “in vitro” sugerem que o IGF1, através da ligação em seu receptor IGF1-R, modula o desenvolvimento e a função dos adipócitos, podendo contribuir para o

desenvolvimento de obesidade (Smith et al, 1988; Scavo et al, 2004). Chen et al (2016) mostraram "in vivo" que a sua hipersecreção estimula o aumento da expressão de genes lipogênicos, através da ativação das vias proteína kinase B (PKB) e mTOR, que contribuem para o desenvolvimento de obesidade, diabetes tipo 2 e esteatose hepática.

#### 1.7.4 Vitamina D

A vitamina D foi primeiramente descrita como um nutriente lipossolúvel que prevenia e curava o raquitismo. Depois foi descoberto que essa vitamina era sintetizada na pele sobre a influência dos raios ultravioletas e interagia com um receptor nuclear similar a outros hormônios e a partir disto, a vitamina D passou a ser considerada um hormônio esteroide (Lazaretti-Castro e Bianco, 2012)

Quando proveniente da dieta, esse hormônio é encontrado em duas formas: o ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>) de origem vegetal; e o colicalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) de origem animal. A produção endógena ocorre em dois passos, a molécula 7-desidrocolesterol presente na pele, após ação dos raios ultravioletas do sol, é transformada em pré-vitamina D<sub>3</sub>. Nessa conformação a vitamina D é biologicamente inativa e para se tornar ativa deve passar por dois processos de hidroxilação, um no fígado e outro no rim. No fígado, a vitamina D é convertida em 25-hidroxivitamina D (25(OH)D ou calcidiol) pela enzima 25-hidroxilase, que apresenta baixa atividade biológica. No rim, o calcidiol é transformado pela enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase, em 1,25 dihidroxivitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D ou calcitriol), que é o hormônio ativo (Reynolds e Bruce, 2016). Seus efeitos biológicos são mediados após a ligação ao seu receptor, denominado receptor de vitamina D (VDR). As funções clássicas da vitamina D envolvem a homeostase de cálcio e metabolismo ósseo. Contudo, outros efeitos já foram descritos, tais como: antiproliferativo, diferenciador celular e imunomodulador (Lazaretti-Castro e Bianco, 2012), secreção de insulina (Sung et al 2012) e regulação da pressão arterial (Burgess et al, 1990).

Estudos vêm mostrando uma relação entre obesidade e status da vitamina D. Em obesos, há uma relação inversa entre vitamina D e IMC, e nesse sentido estes indivíduos cursam com deficiência de vitamina D (Vimaleswaran et al, 2013). Um dos mecanismos propostos para este efeito é que a vitamina D, por ser lipossolúvel, é captada pelo tecido adiposo, reduzindo os seus níveis séricos (Holick, 2007). Com a baixa da concentração de

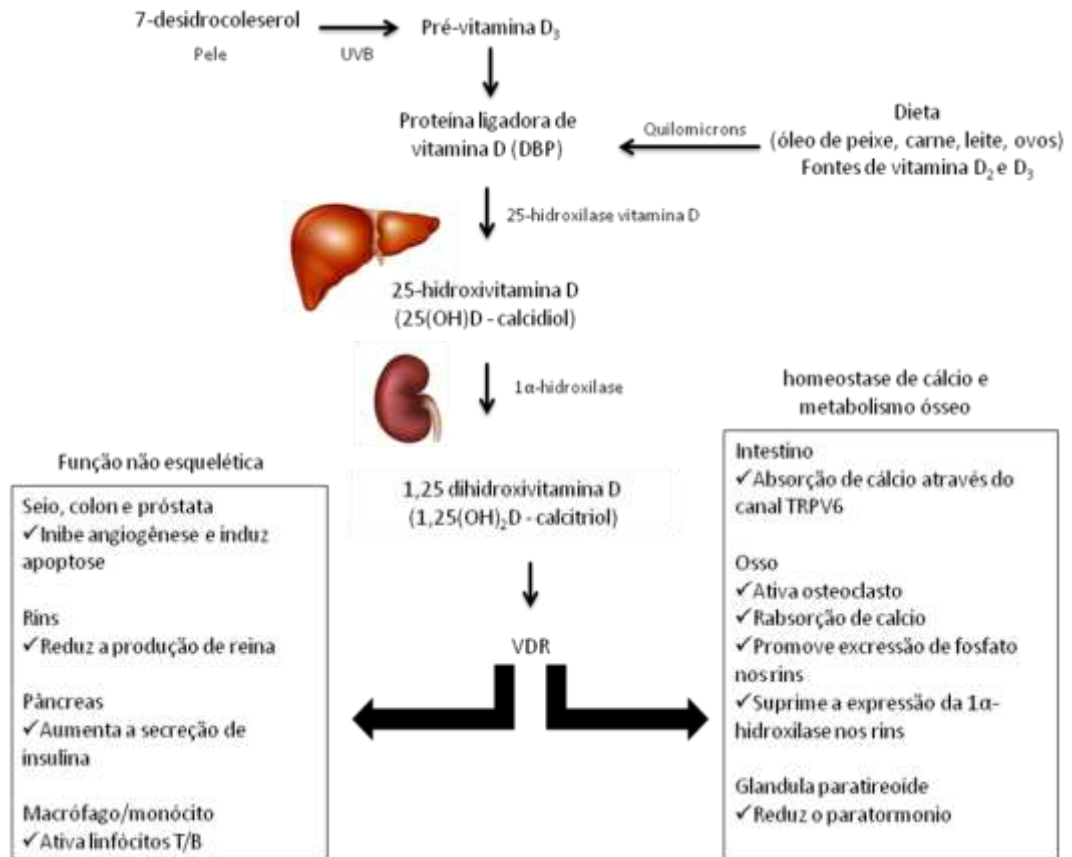


vitamina D pode ocorrer a redução dos níveis de cálcio induzindo o hiperparatireoidismo secundário (Cunningham et al, 2011). A exposição crônica a altos níveis de PTH, eleva os níveis de cálcio iônico nos adipócitos, o que estimula a expressão da enzima de ácido graxo sintase (FAS), que regula a deposição de lipídios e reduz a lipólise (Soares et al, 2012), e dessa forma agravando mais o quadro de obesidade.

#### 1.7.5 Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA)

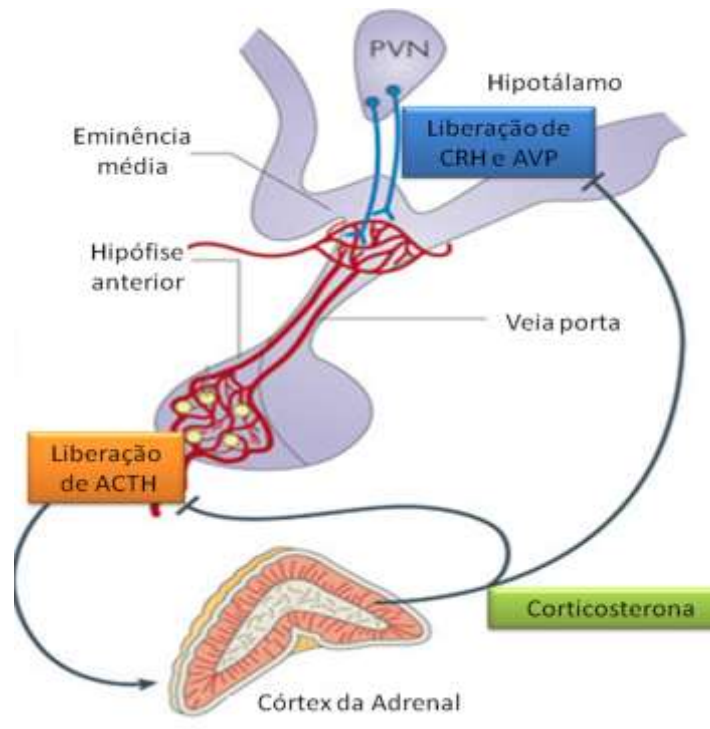
O eixo HPA é composto pelo núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo que libera CRH (hormônio liberador de corticotrofina) no sistema portal hipofisário que chega à pituitária/hipófise estimulando a liberação de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) para circulação, que ao chegar no córtex da glândula adrenal estimula a secreção de glicocorticoide (Juruena et al, 2004). Esse eixo é controlado por feedback negativo do cortisol sobre o CRH e o ACTH (figura 5), regulado por respostas a circunstâncias adversas, modulando o metabolismo de carboidratos, proteínas, e lipídios, além de produzir efeitos anti-inflamatórios e supressão da resposta imune (Tsigos e Chrousos, 2002). O eixo HPA apresenta-se hiper-responsivo em indivíduos obesos, observando-se uma resposta aumentada ao cortisol (Lordelo et al., 2007).

Figura 5 - Síntese, metabolismo e ação da vitamina D.



Fonte: Adaptado de Sung et al 2012.

Figura 6 - Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA).



Fonte: Lightman e Conway-Campbell, 2010.

O cortisol, quando liberado em sua forma inativa (cortisona) é direcionado a tecidos periféricos, principalmente fígado e tecido adiposo, sendo convertido pela enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (11 $\beta$  HSD1). Assim, esta enzima é importante para a ativação local do cortisol (Espíndola-Antunes e Kater, 2007; Stimson et al., 2013). A ativação periférica dos glicocorticóides estimula a gliconeogênese levando a hiperglicemia e hiperinsulinemia, além de favorecer a deposição de gordura nos adipócitos viscerais quando ocorre aumento de ingestão calórica e estimulando a proliferação e diferenciação dos adipócitos, dessa forma contribuindo para o desenvolvimento ou agravamento da obesidade (Incollingo et al., 2015; Hauner et al., 1987; Baudrand e Vaidya, 2015).

A ligação entre glicocorticóides e excesso de adiposidade é clinicamente bem estabelecida e exemplificada em pacientes com síndrome de Cushing (Stimson et al., 2013), ou aqueles que estão em tratamento com corticosteróides exógenos (Hughes et al., 2012). A síndrome de Cushing é uma doença crônica e sistêmica que tem como característica obesidade central, resistência a insulina, dislipidemia hipertensão e osteoporose (Stewart, 2003; Raff e Findling, 2003; Pivonello et al., 2016). A 11 $\beta$  HSD1 no tecido adiposo tem um papel importante nesta situação, pois aumenta a adipogênese e assim, eleva a deposição de adiposidade abdominal (Stewart e Tomlinson, 2002; Bujalska et al., 1999).

## 1.8 Justificativa

Atualmente o desmame precoce é considerado um problema de saúde pública, pois está relacionado com uma série de problemas de saúde, incluindo a obesidade (BRASIL, Ministério da Saúde – 2005). No Brasil, um dos alimentos mais utilizados como substituto do leite materno é o leite de vaca. Ele não é recomendado para o consumo de lactentes porque possui composição inadequada, principalmente pela quantidade excessiva de proteína e relação inadequada de caseína/proteína do soro comparada ao leite humano (Bortolini et al., 2013; Vitolo 2008). O alto consumo de proteínas no primeiro ano de vida está relacionado com excesso de peso durante a infância e na vida adulta. Portanto, essa modificação no padrão alimentar dos lactentes pode estar atuando como fator de *imprinting*, tendo assim o potencial de causar modificações epigenéticas durante o desenvolvimento e causar a programação metabólica (Koletzko et al., 2009; Günther et al., 2007; Hörnell et al., 2013<sup>a</sup>)

Estudos sugerem que toda a problemática envolvida no consumo excessivo de proteínas na primeira infância está diretamente relacionada ao estímulo da secreção de insulina e IGF-I, hormônios que estimulam a diferenciação e proliferação de adipócitos, podendo levar a obesidade. Esse estímulo vem sendo relacionado com as proteínas provenientes do leite de vaca ou produtos lácteos, e não com as proteínas provenientes de vegetais e carne (Hoppe et al, 2004; Hoppe et al, 2005). Dessa forma, fica clara a necessidade de estudar a influência do leite de vaca, o principal substituto lácteo para lactentes, no desenvolvimento das proles em curto prazo e suas consequências futuras para entender se de fato o principal causador dos efeitos negativos do seu uso se deve ao excesso de proteínas ou a exposição a um conjunto de fatores (proteínas, ácidos graxos essenciais, cálcio e vitaminas) próprios do leite de cada espécie, que se, por um lado é altamente adequado para sua espécie, torna-se potencialmente danoso para espécies diferentes.

### **1.9 Hipótese**

O consumo de leite de vaca (um alimento rico em proteína e compostos biologicamente ativos) em detrimento ao aleitamento materno exclusivo, tem impacto sobre a regulação endócrino-metabólica a longo prazo, tornando o animal mais susceptível a desenvolver obesidade na vida adulta. Além disto, esse fenômeno pode ser diferente de acordo com o gênero do animal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos endócrino-metabólicos imediatos e tardios, da complementação alimentar com leite de vaca, enriquecido ou não com caseína, em ratos e ratas Wistar no terço final da lactação.

### 2.2 Objetivos específicos

#### No leite:

- ✓ Analisar a composição bioquímica e o perfil eletroforético das proteínas;

#### Na prole de ambos os sexos, aos 21 e 180 dias de idade:

- ✓ Avaliar o peso corporal e ingestão alimentar;
- ✓ Avaliar a composição corporal *post-mortem* (conteúdo total de gordura e proteínas e gordura visceral).
- ✓ Avaliar a glicemia e o perfil lipídico;
- ✓ Avaliar o perfil hormonal (IGF-I, insulina, leptina, corticosterona e vitamina D);
- ✓ Avaliar a conversão e/ou ação do glicocorticoide no fígado e no tecido branco adiposo visceral.

#### Nos ratos machos e fêmeas apenas na vida adulta:

- ✓ Estudar a composição corporal *in vivo*: massa gorda corporal, massa livre de gordura (magra) e fluidos;
- ✓ Estudar a morfologia do tecido adiposo branco visceral;
- ✓ Estudar a via de sinalização da leptina no núcleo

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A utilização dos animais e os procedimentos experimentais foram aprovada pelo Comitê de Cuidados e Uso Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (CEA / 012/2015). Os ratos Wistar foram mantidos alojados em uma sala com temperatura controlada ( $25 \pm 1^\circ \text{C}$ ) com ciclos artificiais de luz-escurecimento (luzes às 07:00 h, luzes apagadas às 19:00 h) durante todas o período experimental.

#### 3.1 Banco de leite de rata

Antes de iniciar a intervenção experimental, foi criado um banco de leite de rato, com leite específico para cada dia da intervenção de acordo com a idade dos filhotes, esse procedimento foi necessário, devido a mudança na composição do leite durante o período de lactação. O leite foi coletado de PN14 até PN20, as amostras de cada dia foram unidas, formando um pool, e doses desse pool foram administradas nos filhotes. Para este procedimento, utilizamos 70 lactantes do biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina, que foram separadas dos filhotes por 2h, após esse tempo receberam uma injeção de oxitocina (5 UI / ml sc - Eurofarma, São Paulo, SP) . Após 10 minutos, as lactantes foram anestesiadas (2,2,2 tribromoetanol - Avertin, 200 mg / kg de massa corporal, via ip, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e o leite foi extraído por ordenha manual. Cada lactante foi ordenada a cada dois dias para evitar o estresse e mudanças na composição do leite. O leite de cada dia específico foi unido, armazenado em freezer ( $-20^\circ \text{C}$ ) até o dia do uso no experimento, e uma amostra foi coletada para posterior análise. Durante o experimento, o leite de rata foi descongelado naturalmente todos os dias, até atingir a temperatura ambiente.

#### 3.2 Composição do leite

Foram realizadas as análises de carboidratos, proteína total e gordura total, das amostras do banco de leite rata (pool de cada dia) e leite de vaca em pó sem suplementação

com micronutrientes (Fazendas do Rio, Lt 651408, SIF / DIPOA 0047/2616). O teor de carboidratos foi estimado pelo método colorimétrico utilizando ácido pícrico (Erb *et al*, 1977). O teor de lactose foi medido por um método colorimétrico, usando a curva padrão de lactose (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O teor de proteína foi estimado pelo método colorimétrico, descrito por Peterson (Peterson, 1977). utilizando albumina de soro bovino (Sigma, St. Louis, MO, EUA) como padrão. O teor de lipídios totais foi determinado pelo método colorimétrico utilizando um kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). A energia do leite foi calculada usando calorias de cada macronutrientes, nas quais os carboidratos e proteínas foram multiplicadas por 4 e a gordura foi multiplicada por 9 para obter o valor calórico em Kcal (Tabela 7).

### 3.3 Perfil eletroforético das proteínas do leite

As amostras de leite foram aquecidas a 95 °C durante 5 minutos num tampão (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, SDS de dodecilsulfato de sódio a 1%, 5% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol e 0,001% de azul de bromofenol). As amostras fervidas (200 ug de proteína total) foram transportadas para electroforese utilizando gel de poliacrilamida SDS a 12%. Em seguida, o gel foi colorido com solução colorante (Coomassie brilliant Brilliant Blueeu R-250 0,1%, metanol 50%, ácido acético glacial 10% e água 39, 9%) sob agitação overnight, à temperatura ambiente. O gel foi descolorido com uma solução (metanol 50%, ácido acético glacial 7% e água 43%), até que o gel estivesse limpo. Finalmente, as bandas de proteínas foram expostas com o ImageQuant LAS (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). O tipo de proteína foi determinado por peso molecular e, tanto a área como a densidade das bandas foram quantificadas pelo software Image J (Wayne Rasband National Institute of Health, MA, EUA).

### 3.4 Modelo experimental da introdução do leite de vaca em ratos durante a lactação

Trinta fêmeas virgens (3 meses de idade) foram enjauladas com ratos machos na proporção de 3: 1. Após o acasalamento, cada rata foi individualizada em gaiolas com acesso livre a alimentos e à água até o desmame. No nascimento, que foi considerado o primeiro dia pós-natal (PN1), as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes por mãe (3 fêmeas e 3 machos) para maximizar o desempenho da lactação. Desde o nascimento até PN13, os filhotes foram mantidos com suas mães para amamentar normalmente. Em PN14, os animais foram divididos em 3 grupos experimentais:

(1) leite de rata (grupo RM, n = 10) - filhotes receberam leite de rata por administração oral em uma seringa (20 mL / kg) do banco de leite rata (utilizado como grupo controle);

(2) leite de vaca (grupo CM, n = 10) - filhotes receberam suplementação com leite de vaca por administração oral em uma seringa (20 mL / kg / dia);

(3) leite de vaca hiperproteico (grupo CM-H, n = 10) - os filhotes receberam leite de vaca acrescido de caseína (duas vezes mais proteína do que o leite de rata) por administração oral em uma seringa (20 mL / kg) para mimetizar o excesso de proteína que ocorre quando uma criança recebe leite de vaca.

Antes da administração do leite, os filhotes foram separados de suas mães por 40-60 minutos, para garantir o esvaziamento gástrico (Pérez-Cano *et al*, 2007). Nesse momento, os filhotes foram pesados, e os seus comprimentos foram medidos.

A escolha da suplementação com leite de vaca apenas uma vez por dia para animais é baseada na observação clínica na qual, as mães oferecem uma mamadeira noturna de leite de vaca para bebês, na intenção de garantir saciedade e sono ininterrupto.

É importante notar que o leite de vaca tem menos proteína do que o leite de rato (Jenness, 1986). Assim, adicionamos caseína a partir de leite bovino (C3400, SLBM5975V, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) no grupo CM-H: 13 g de caseína foram adicionados ao leite de vaca, totalizando 16g de caseína por 100 ml de leite de vaca. O leite de vaca foi reconstituído diariamente com água destilada filtrada, seguindo as instruções do fabricante. A adição de caseína no leite de vaca foi realizada no momento da administração.

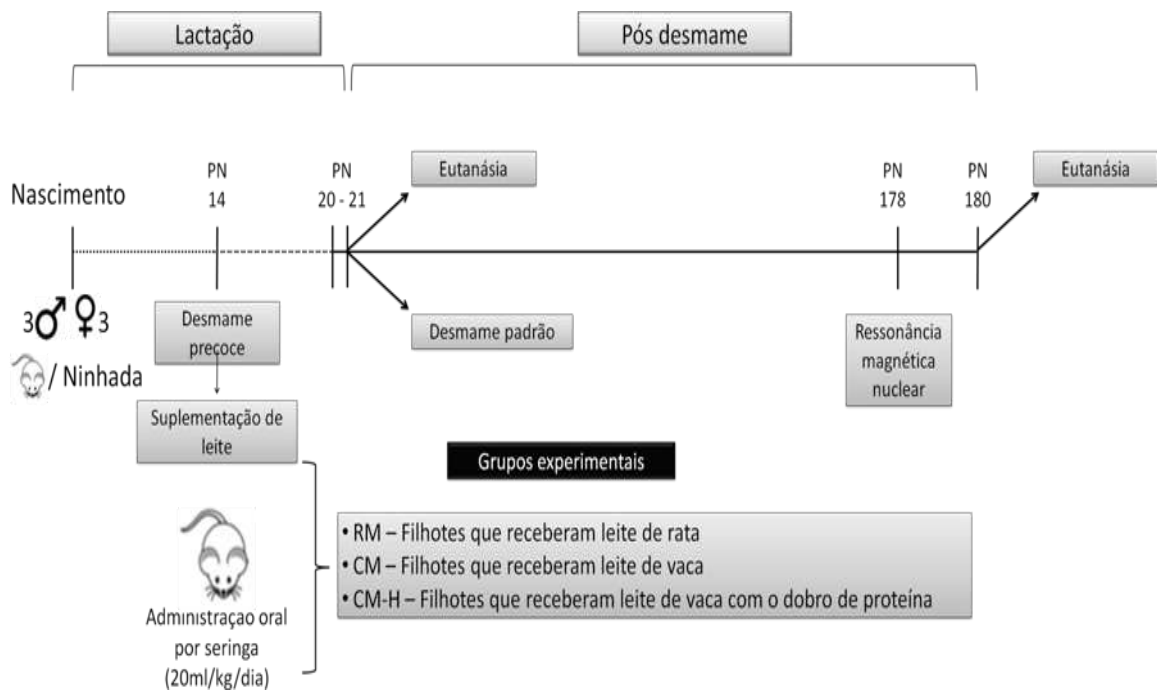
Do nascimento até o desmame (PN21), a massa corporal (MC) dos filhotes foi medida diariamente; O comprimento do corpo foi medido em PN14, PN17 e PN21. Desde o desmame até o dia da eutanásia (PN180), a massa corporal e a ingestão alimentar foram monitoradas a



cada 4 dias, enquanto o comprimento do corpo foi monitorado a cada 15 dias. O esquema do modelo experimental é demonstrado na figura 7.

O ciclo estral foi analisado na prole feminina dos 3 grupos por esfregaços vaginais coletados todas as manhãs desde PN150 até PN180. Somente ratas que apresentaram um ciclo estral regular de 4-5 dias foram utilizadas neste estudo. Todas as fêmeas foram mortas em diestro.

Figura 7 - Linha do tempo experimental. O modelo de desmame precoce por suplementação com leite de vaca em ratos lactentes.



Fonte: A autora, 2017.

### 3.5 Eutanásia

Em PN 21, 2 filhotes (1 macho e 1 fêmea) de cada ninhada, após 2 h de jejum e, assim como em PN180, 4 cachorros (2 machos e 2 fêmeas), de cada ninhada após 12 h de jejum, foram anestesiado com uma dose não letal da solução (2:1) de cloridrato de cetamina (Cetamin®, 50 mg / ml) e cloridrato de xilazina (Xilazin®, 20 mg / ml), na dose de 1ml /

1000 g de massa corporal e foram mortos por punção cardíaca. O sangue foi coletado e as amostras foram centrifugadas (1.500 x g durante 15 min a 4 °C) para obter soro, que foi mantido individualmente a -20 ° C até os ensaios. O depósito de gordura Retroperitoneal foi rapidamente coletado e pesado para avaliação da adiposidade central. Os dados foram expressos como gordura visceral / massa corporal (mg). Todos os tecidos foram rapidamente coletados, pesados e armazenados a -80°C para posteriores análises.

### **3.6 Composição corporal: Ressonância magnética nuclear (RMN)**

Em PN178, a massa total de gordura e a massa magra (ou massa livre de gordura) foram analisadas utilizando uma ressonância magnética nuclear (RMN) para pequenos animais vivos, sem a utilização de anestesia prévia. Resumidamente, os ratos foram digitalizados usando equipamentos (Whole Body Composition Analyzer, Bruker's Minispec LF90 TD-NMR, Rheinstetten, Alemanha). No dia do teste, uma verificação de controle de qualidade das tensões internas, temperatura, ímãs e parâmetros de RMN foi realizada usando um padrão fornecido pelo fabricante. Os ratos foram colocados em um cilindro de plástico transparente (50 mm de diâmetro) e imobilizados pela inserção de um êmbolo ajustado no cilindro. O tubo foi colocado na câmara de leitura do equipamento por aproximadamente 2 minutos, para a leitura. A avaliação foi cega porque o técnico de RMN não conhecia o protocolo experimental. Os dados foram expressos em % de massa gorda, % de massa magra e % de fluido.

### **3.7 Composição corporal: Método da carcaça**

As carcaças foram pesadas, autoclavadas durante 1 h e homogeneizadas em água destilada (1:1). As amostras homogeneizadas foram armazenadas a 4 ° C até a realização das análises. Três gramas do homogenato foram utilizados para determinar o teor de gordura corporal gravimetricamente. As amostras foram hidrolisadas em banho maria com agitação a 70 ° C durante 2 h com 30% de KOH e etanol. O total

de ácidos graxos e o colesterol não esterificado foram removidos usando três lavagens sucessivas com éter de petróleo. Após a secagem durante a noite em uma capela de exaustão, os tubos foram pesados e os resultados foram expressos em % de gordura (Leshner *et al*, 1972). As concentrações de proteína total foram determinadas pelo método de Lowry (Lowry, 1951). Os dados foram expressos como % de proteína.

### 3.8 Análise morfométrica de adipócitos

Fragmentos do tecido adiposo visceral (depósito retroperitoneal) foram fixados numa solução (1,27 M-formaldeído, tampão 0,1 M-fosfato, pH 7,2) e depois foi realizado a inclusão em parafina; Foram obtidas secções de 5 µm (microtome Microtec-CUT 4050, SC, EUA) e coradas com hematoxilina / eosina. Um microscópio de luz (modelo BX40 Olympus, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital (Olympus DP71, Tóquio, Japão) foi utilizado para examinar a morfologia. As medidas morfométricas foram realizadas em 12 seções de série tomadas aleatoriamente a cada 100 µm para cada seção. Foram medidos cinco adipócitos em cada seção (50 células analisadas por rato, n = 5-6 ratos por grupo) e a área de seção transversal de cada adipócito foi determinada usando o software Image-Pro Plus, versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) com o uso de imagens digitais adquiridas aleatoriamente (formato TIFF, cor de 36 bits, 1360x1024 pixels, 40x).

### 3.9 Análise de hormônio sérico: Ensaio imunoenzimático (ELISA), radioimunoensaio (RIE) e imunoensaio eletroquimioluminescente (ECLIA)

As determinações foram feitas em um ensaio e as amostras foram analisadas em duplicado. A leptina foi determinada usando um kit de ratos ELISA (EMD Millipore Corporation Research Park Drive, St Charles, MA, EUA) e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) foi medido usando o imunoensaio IGF-1 de rato / rato Quantikine ELISA (MG100, R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A insulina e a corticosterona foram avaliadas por kits RIE específicos (ImmuChem TM 125I, tubo revestido, ICN Biomedicals Inc., NY, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A

25(OH)D foi quantificado utilizando um kit comercial ECLIA (ensaio total Elecsys Vitamin D, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Este hormônio geralmente é medido para determinar o estado geral da vitamina D (Food and Nutrition Board, 1997; Holick *et al*, 2011).

### 3.10 Análise Bioquímica

Os triglicerídeos e o colesterol total sérico foram analisados utilizando um kit Bioclin (triglicerídeos monoreagentes, K117 e colesterol monoreagente, K083). Os teores de colesterol hepático e triglicerídeos foram analisados utilizando 50 mg da amostra de tecido que foi homogeneizado com 1 ml de álcool isopropílico (cod. 139, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em um sonicador e depois centrifugado (3219,8xg / 10 min a 4 ° C). Para o ensaio, utilizou-se 10 µl do sobrenadante de acordo com o protocolo dos kits acima.

### 3.11 Medição da sensibilidade à glicemia e insulina

A glicemia foi determinada em amostras de sangue da veia da caudal de ratos usando um glicosímetro após jejum de 2 ou 12h (ACCU-CHEK Advantage; Roche Diagnostics). A sensibilidade à insulina foi avaliada de acordo com 2 fórmulas : HOMA-IR - [insulina sérica (µUI / ml) X glicose no soro (mmol / l)] / 22,5; HOMA-β [Insulina (µUI / ml) X 20] / glicose sérica (mmol / l) - 3,5.

### 3.12 Dissecção do Punch

As seções cerebrais coronais congeladas foram cortadas usando um criostato (Hyrax C25, Zeiss, Alemanha) e os punches do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC; bregma 2,1 a 3,6 mm) foram extraídos dos cérebros usando as referências anatômicas seguindo o atlas das coordenadas estereotáxicas (Paxinos & Watson, 1998). As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para determinação do teor de proteína da via de sinalização da leptina por Western blot.

### 3.13 Western Blot

Medimos o teor de proteína da sinalização de leptina no ARC hipotalâmico (OBRb; pJAK2; pSTAT3; SOCS3) e o metabolismo dos glicocorticóides no fígado (11 $\beta$ HSD1 e GR $\alpha$ ). As amostras de tecidos foram homogeneizadas em tampão RIPA (50 mM Tris4 HCl (pH 7,4), 1% de NP-40, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM e NaF 1 mM), com cocktail de inibidor de protease (Roche Diagnostics Indianapolis, IN, EUA). 60  $\mu$ l deste tampão foi utilizado para homogeneizar o ARC e para o fígado foram utilizados 2 ml. A concentração de proteína foi determinada usando o kit de teste de proteína Pierce BCA (Thermo Scientific, CA, EUA). Os homogeneizados foram analisados pelo método SDS-PAGE. As amostras contendo 10  $\mu$ g do ARC e 30  $\mu$ g do fígado usando um gel de poliacrilamida a 10% foram submetidas a eletroforese e foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (membrana Hybond P ECL, Amersham Biosciences, Londres, Reino Unido). As membranas foram incubadas com Tween-TBS (0,1%) contendo 5% de albumina durante 45 min. Em seguida, as membranas foram lavadas com Tween-TBS (0,1%) e incubadas com um anticorpo primário específico anti- $\beta$ -actina, anti-11 $\beta$ HSD1 e anti-GR $\alpha$  (1: 500, Sigma-Aldrich, Invitrogen Corporation CA, EUA); anti-OBR-b, anti-pJAK2, anti-pSTAT3 e anti-SOCS3 (1: 500, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram incubados durante a noite a 4 °C. As membranas foram lavadas três vezes com Tween-TBS (0,1%), seguido de incubação durante 1 hora com um anticorpo secundário apropriado conjugado com biotina (1: 7000, anti-coelho, anti-camundongo ou anti-cabra da Sigma

Aldrich, Invitrogen Corporation CA, EUA) à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada novamente três vezes com Tween-TBS (0,1%) seguido de incubação com estreptavidina (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, EUA) na mesma diluição que o anticorpo secundário. As bandas de proteínas foram visualizadas por quimioluminescência (Kit ECL plus, Amersham Biosciences, Londres, Reino Unido) em seguida foi realizada a exposição das membranas no ImageQuant LAS (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). A área e a densidade das bandas foram quantificadas pelo software Image J (Wayne Rasband National Institute of Health, MA, EUA) e normalizadas contra as bandas obtidas para a  $\beta$ -actina.

### 3.14 Reação em cadeia da polimerase e transcriptase reversa (RT-PCR)

O tecido adiposo branco visceral (retroperitoneal) foi removido e armazenado em RNAlater (Qiagen, Valencia, CA) à -80 °C. O ARN total foi extraído com o uso do kit Rissasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen GmbH, Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante e quantificado com um espectrofotômetro NanoVueTMPlus (GE Healthcare, Buckinghamshire). As amostras de ARN foram diluídas para equalizar as concentrações (1  $\mu$ g /  $\mu$ l) e armazenadas em freezer -80 °C durante 24 horas. O cDNA foi preparado usando as amostras de RNA equalizadas usando a Transcriptase Reversa M-MLV (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para RT-PCR e Oligo (dT) 15 Primer (Promega, Madison, WI, EUA). Para garantir que o produto final não tenha sido contaminado com DNA genômico, o que poderia interferir com a amplificação do produto final, utilizamos um controle negativo no ensaio. A construção deste controle foi realizada com o conjunto de todas as amostras seguindo o mesmo procedimento passo a passo, mas os tubos não receberam transcriptase reversa, então não deve haver DNA no produto final e nada para amplificar quando submetido à RT-PCR. Os níveis de mRNA de 11 $\beta$ HSD1 (F: 5'-ACT GTG CCT TTG ATG ATC TCC -3'; R: 5'- GTC AAC GTG TCC ATC ACT CTC -3') foram medidos usando SYBR Green PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A RT-PCR em tempo real foi realizada em triplicado para cada amostra utilizando um sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 (Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA). Os iniciadores e sondas de oligonucleótidos foram preparados por Applied Biosystems® (Foster City, CA, EUA). A co-amplificação do

mRNA de  $\beta$ -actina de rato (F: 5'- ACC CAG ATC ATG TTT GAG ACC-3 ' ; R: 5'- CAT ACC CAA GAA GGA AGG CT -3'), um controle interno variante, foi realizado em todas as amostras. Os ensaios foram realizados em triplicado, e os resultados foram normalizados para os níveis de mRNA de  $\beta$ -actina usando o método  $2\Delta\Delta CT$  (Livak & Schmittgen, 2001).

### 3.15 Análise estatística

O programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para análises estatísticas e gráficos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Para os dados de evolução do tempo, a significância estatística foi determinada por ANOVA de medidas repetidas de duas vias (modelo misto) seguido pelo teste Bonferroni post hoc. Outros dados foram analisados por ANOVA unidirecional seguido do teste Bonferroni post hoc. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ , e as tendências foram consideradas significativas quando  $p < 0,1$  (a tendência foi representada por um traço abaixo do símbolo).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Composição do leite e perfil eletroforético das proteínas

A Tabela 7 descreve a composição bioquímica do leite. O leite de rato não diferiu nos teores de proteínas e carboidratos de PN14 a PN20, mas o conteúdo lipídico reduziu quase 77% do meio até o final do período de lactação. Ao comparar os 2 tipos de leite, o leite de vaca apresentou menor teor de proteína (-62%) ao longo da lactação e menor teor de gordura no meio da lactação. No entanto, o teor de gordura aumentou no leite de vaca no final da lactação, e o teor de carboidratos foi maior no leite de vaca em comparação com o leite de rato.

Tabela 7 - Composição do leite.

	<b>Proteína</b>	<b>Carboidrato</b>	<b>Lipídeo</b>	<b>Kcal</b>	<b>KJ</b>
	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>		
<b>Leite de Rata</b>					
<b>PN 14</b>	8.07	2.73	9.36	127.48	533.39
<b>PN 15</b>	8.11	2.91	6.67	104.16	435.81
<b>PN 16</b>	8.54	2.56	5.13	90.53	378.77
<b>PN 17</b>	8.18	2.56	6.32	99.82	417.65
<b>PN 18</b>	8.22	2.42	5.86	95.28	398.65
<b>PN 19</b>	7.92	3.16	4.40	83.94	351.21
<b>PN 20</b>	8.71	2.83	2.17	65.67	274.75
<b>Leite de vaca</b>					
<b>CM</b>	3.06	4.92	4.96	76.55	320.29
<b>CM-H</b>	16.06	4.92	4.96	128.55	537.86
<b>Fórmula láctea*</b>					
	1,8 - 3,0	9,0 - 14	4,4 - 6	-	-

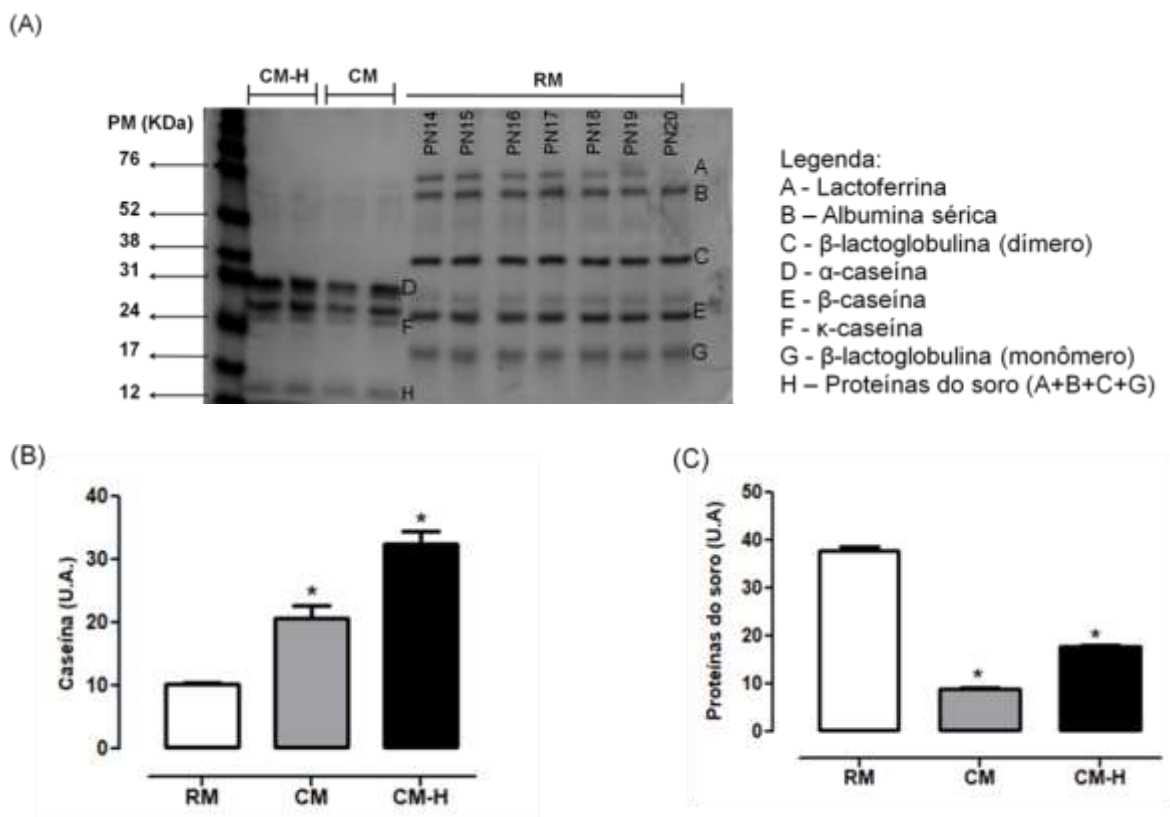
Legenda: Leite de rata – Os valores referem-se à análise do leite de um pool de leite coletado diariamente de 35 ratas do banco de leite de rata. CM – Leite de vaca; CM-H – Leite de vaca com o dobro de proteína quando comparado ao leite de rata; PN: dia pós-natal. \* Codex alimentarius. Todos os valores expressos por 100KCAL de produto pronto.

Fonte: A autora, 2017.



O perfil eletroforético das proteínas do leite é mostrado na figura 8. O leite de vaca apresentou maior teor de caseína em comparação com o leite de rato (+ 102%;  $p < 0,05$ ), mas foi menor quando comparado com CM-H (-36%;  $p < 0,05$ ). Além disso, o leite de vaca apresentou menor teor de proteína de soro de leite em comparação com o leite de rato (-76% vs RM; -51% vs CM-H;  $p < 0,05$ ).

Figura 8 - Perfil eletroforético das proteínas do leite.



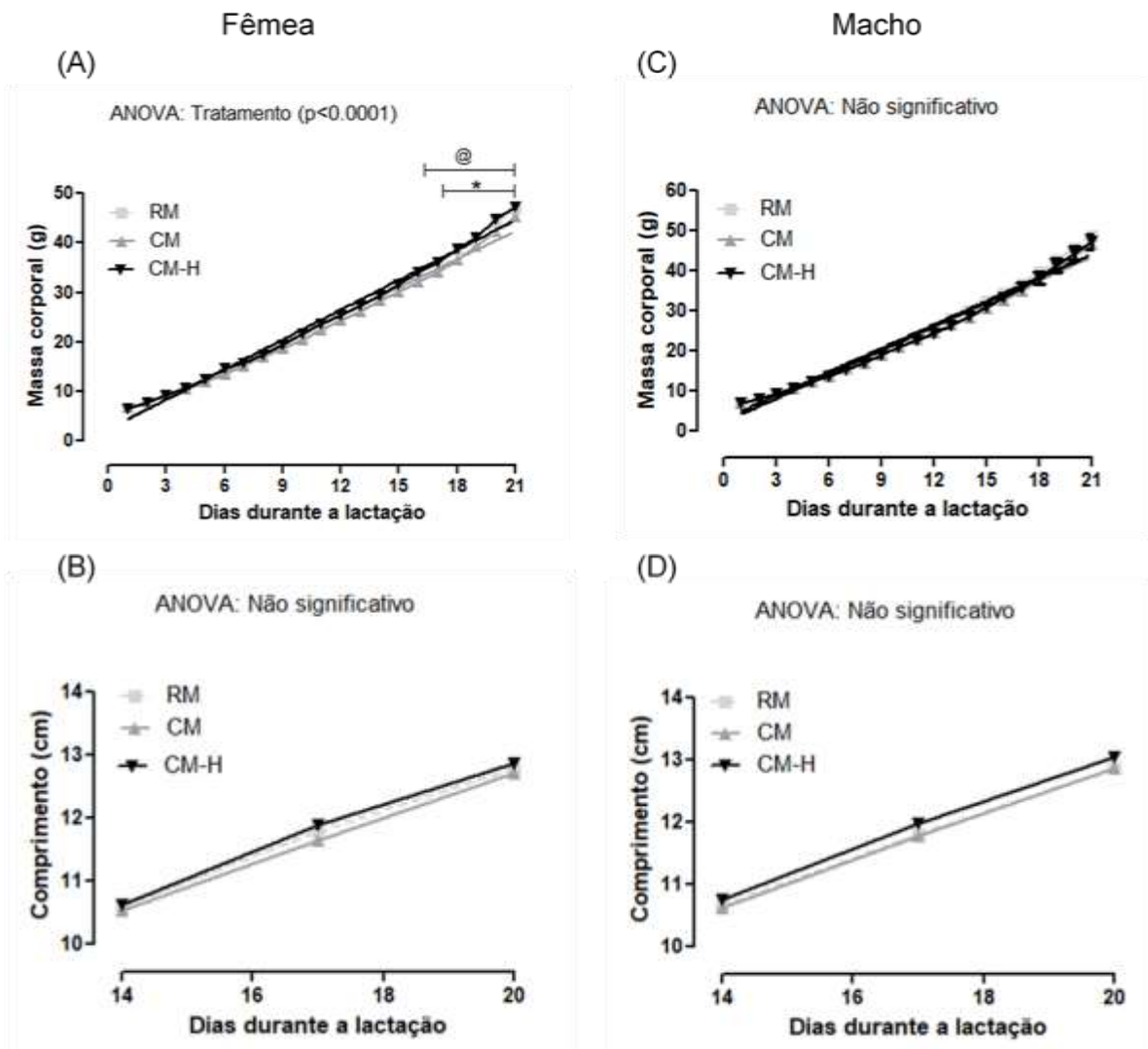
Legenda: (A) imagem representativa da eletroforese de proteína do leite em gel de acrilamida, (B) teor de caseína no leite e (C) teor de proteína de soro no leite. RM - leite de rato de PN 14 a 20 (os valores referem-se à análise de leite de um grupo de leite coletado diariamente de 35 mães de rato do banco de leite murino), CM - leite de vaca, CM modificado com CM-H com maior teor de proteína em comparação com o rato leite. PN: pós-natal; MW: peso molecular; KDa: kilodalton; Os valores são dados como média  $\pm$  SEM, \* vs RM. ( $P < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2017

## 4.2 Mudanças na prole durante a amamentação

No final da lactação, as fêmeas do grupo CM apresentaram menor peso corporal quando comparadas com os grupos RM e CM-H (-3% e -4%, respectivamente,  $p < 0,05$ ; Figura 9A). Não houve diferença no comprimento do corpo durante a lactação entre os grupos para ambos os sexos (figuras 9B e 9D).

Figura 9 - Evolução da massa corporal e do comprimento de ratos desmamados precocemente durante a lactação.



Legenda: Massa corporal (A: fêmea, C: macho) e comprimento corporal (B: fêmea, D: macho) durante a lactação. Grupos: RM - filhotes que receberam leite de rato, CM - filhotes que receberam leite de vaca, CM - H - filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico. Os valores são dados como médias  $\pm$  SEM de 29-31 ratos / grupo. \* RM vs CM, @ CM-H vs CM. ( $P < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2017.

Em PN21, as fêmeas não apresentaram diferença na massa de gordura retroperitoneal, enquanto os machos do grupo CM apresentaram menor retroperitoneal em comparação com o grupo RM (-27%;  $p < 0,1$ ) e uma tendência para a menor gordura visceral no CM-H grupo (-23%;  $p < 0,1$ ) (Tabela 8). Nenhuma diferença foi observada na composição das carcaças entre os grupos em ambos os sexos (Tabela 8).

Tabela 8 - Composição corporal de ratos precocemente desmamados durante a lactação.

<b>Desmame (PN21)</b>			
<b>FÊMEA</b>	<b>RM</b>	<b>CM</b>	<b>CM-H</b>
<b>TAB ret / massa corporal (mg)</b>	2.114 ± 0.2185	1.914 ± 0.1346	2.423 ± 0.1762
<b>Proteína corporal total (%)</b>	27.22 ± 1.057	28.46 ± 1.010	29.30 ± 1.595
<b>Gordura corporal total (%)</b>	10.92 ± 0.6476	10.38 ± 0.6573	11.26 ± 0.4394
<b>MACHO</b>			
<b>TAB ret / massa corporal (mg)</b>	2.780 ± 0.2580	2.020 ± 0.1449 * <sub>u</sub>	2.635 ± 0.1383
<b>Proteína corporal total (%)</b>	34.44 ± 1.937	30.93 ± 2.260	37.05 ± 2.927
<b>Gordura corporal total (%)</b>	5.234 ± 0.4271	4.977 ± 0.3657	5.043 ± 0.1659

Legenda: TAB ret: Tecido adiposo branco retroperitoneal. Grupos: RM – filhotes que receberam leite de rata, CM – filhotes que receberam leite de vaca, CM-H – filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico. PN: Dia pós-natal; Valores representados como ± EPM de 8 – 11 ratos/grupo. Diferença significativa entre os grupos: \* vs RM ( $p < 0.05$ ) / @ vs CM-H ( $p < 0.1$ )

Fonte: A autora, 2017.

Não foram observadas alterações nos lipídios no soro ou no fígado entre os grupos nos diferentes sexos em PN21 (Tabela 9). Quanto ao perfil hormonal em PN21, uma maior corticosteronemia foi encontrada nos machos do grupo CM-H (+ 50% vs. RM e + 37% CM;  $p < 0,05$ ; Tabela 9). Enquanto que os níveis séricos de glicose, insulina, IGF-1, leptina e vitamina D não foram significativamente alterados em ambos os sexos (Tabela 10).

Tabela 9 - Perfil Lipídico durante a lactação.

<b>Desmame (PN21)</b>				
	<b>FÊMEA</b>	<b>RM</b>	<b>CM</b>	<b>CM-H</b>
<b>SORO</b>	<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	120.4 ± 6.469	131.2 ± 4.475	121.2 ± 2.700
	<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	120 ± 11.95	96.24 ± 4.868	143 ± 18.03
<b>FÍGADO</b>	<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	1.39 ± 0.0318	1.52 ± 0.0616	1.46 ± 0.0317
	<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	1.71 ± 0.0364	1.69 ± 0.0335	1.72 ± 0.0546
	<b>MACHO</b>	<b>RM</b>	<b>CM</b>	<b>CM-H</b>
<b>SORO</b>	<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	144.3 ± 7.026	137 ± 7.017	138.1 ± 4.895
	<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	98.57 ± 7.929	80.70 ± 8.165	90.35 ± 13.18
<b>FÍGADO</b>	<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	1.54 ± 0.0315	1.51 ± 0.0314	1.55 ± 0.0478
	<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	2.16 ± 0.0711	2.04 ± 0.0551	2.19 ± 0.1251

Legenda: Grupos: RM – filhotes que receberam leite de rata, CM – filhotes que receberam leite de vaca, CM-H – filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico. PN: Dia pós-natal; Valores representados como ± EPM de 7 – 11 ratos/grupo.

Fonte: A autora, 2017.

Tabela 10 - Homeostase glicêmica e perfil hormonal durante a lactação.

<b>Desmame (PN21)</b>			
<b>FÊMEA</b>	<b>RM</b>	<b>CM</b>	<b>CM-H</b>
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	107.0 ± 2.444	112.0 ± 4.464	112.9 ± 2.922
<b>Insulina (uIU/mL)</b>	23.04 ± 1.955	24,29 ± 2.419	22.07 ± 2.703
<b>HOMA-IR</b>	9.094 ± 0.5614	6.830 ± 0.8677	6.198 ± 0.8898
<b>HOMA beta</b>	74.24 ± 6.570	74.08 ± 6.275	66.76 ± 7.531
<b>IGF-1 (pg/mL)</b>	5525 ± 344.1	5072 ± 336.1	5803 ± 328.4
<b>Leptina (ng/mL)</b>	3.269 ± 0.3298	3.703 ± 0.3267	3.931 ± 0.3579
<b>Corticosterona (ng/mL)</b>	325.1 ± 68.98	452.5 ± 71.33	553.7 ± 98.50
<b>25(OH)D (ng/dL)</b>	4.968 ± 1,174	6.882 ± 1,125	4.441 ± 0.336
<b>MACHO</b>			
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	113.5 ± 3.836	114.9 ± 3.304	121.0 ± 2.759
<b>Insulina (uIU/mL)</b>	18.79 ± 1.639	20.75 ± 1.595	18.63 ± 2.513
<b>HOMA-IR</b>	5.311 ± 0.5994	5.917 ± 0.5502	5.571 ± 0.7758
<b>HOMA beta</b>	56.07 ± 4.446	61.76 ± 4.782	52.14 ± 7.540
<b>IGF-1 (pg/mL)</b>	8283 ± 1182	6031 ± 686.0	7592 ± 714.2
<b>Leptina (ng/mL)</b>	3.773 ± 0.3423	3.313 ± 0.2885	3.587 ± 0.3136
<b>Corticosterona (ng/mL)</b>	267.5 ± 47.35	340 ± 48.29	536.5 ± 47.51 *#
<b>25(OH)D (ng/dL)</b>	6.493 ± 1.501	5.435 ± 0.778	3.623 ± 0.344

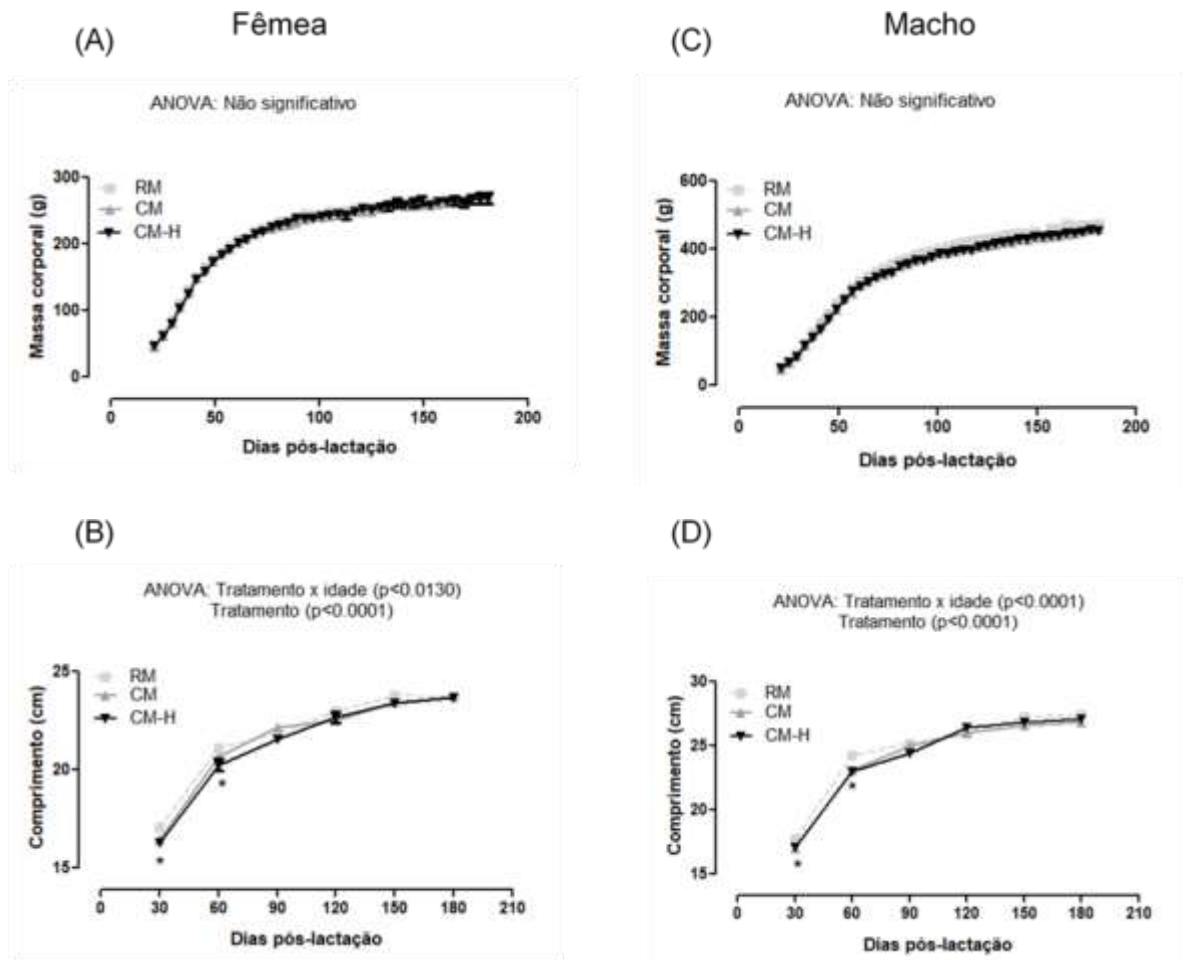
Legenda: Grupos: RM – filhotes que receberam leite de rata, CM – filhotes que receberam leite de vaca, CM-H – filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico; PN: Dia pós-natal; HOMA-IR: Modelo de Avaliação da Homeostase – Resistência à insulina; HOMA- beta: Modelo de Avaliação da Homeostase – Capacidade funcional das células beta; IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina; Valores representados como ± EPM de 6 – 11 ratos/grupo. Diferença significativa entre os grupos: \* vs RM / # vs CM (p<0.05).

Fonte: A autora, 2017.

#### 4.3 Mudanças na prole no período pós-desmame

Na idade adulta, o peso corporal permaneceu inalterado entre os 3 grupos de ambos os sexos (Figuras 10A e 10C). Com relação ao comprimento corporal, em PN30 e PN60, o grupo RM de ambos os sexos apresentou um aumento quando comparado aos outros grupos CM (p <0,05, fêmeas, Figura 4B e machos, Figura 10D).

Figura 10 - Massa corporal e evolução do comprimento de ratos precocemente desmamados após o período de desmame.

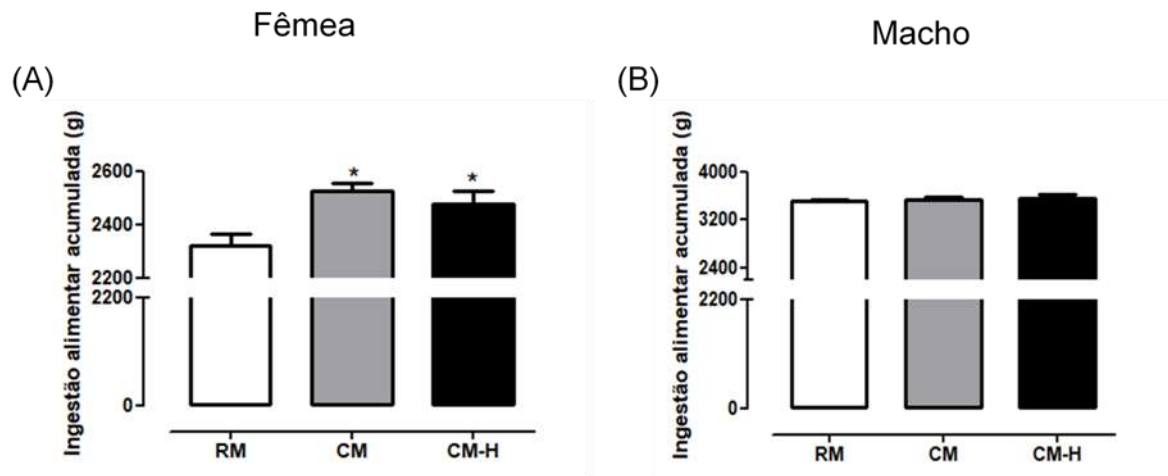


Legenda: Massa corporal (A: fêmea, macho C) e comprimento do corpo (B: fêmea, D: macho) durante o desenvolvimento. Grupos: RM - filhotes que receberam leite de rato, CM - filhotes que receberam leite de vaca CM - H - filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico. Os valores são dados como médias  $\pm$  SEM de 17-20 ratos / grupo. \* vs RM. ( $P < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2017.

As fêmeas adultas dos grupos CM apresentaram maior ingestão alimentar em comparação com o grupo RM (CM: + 8%; CM-H: + 7%;  $p < 0,05$ ; Figura 11A), enquanto que os machos adultos não apresentaram diferenças entre os grupos (Figura 11B).

Figura 11 - Ingestão alimentar acumulada da prole precocemente desmamada.



Legenda: A ingestão acumulada de alimentos foi apresentada como a quantidade de alimento ingerido em gramas de PN30-PN180. (A) ingestão alimentar de fêmeas e (B) ingestão alimentar de machos. Grupos: RM - filhotes que receberam leite de rato, CM - filhotes que receberam leite de vaca, CM - H - filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico. Os valores são dados como médias  $\pm$  SEM de 15-20 ratos / grupo. \* Vs RM. (P <0,05).

Fonte: A autora, 2017.

No que diz respeito à composição corporal avaliada pela RMN, em PN178, nenhuma diferença entre os grupos foi observada na massa de gordura corporal total, na massa magra total e no fluido corporal nas proles em ambos os sexos (Tabela 11).

Tabela 11 - Composição corporal pela ressonância magnética nuclear de ratos adultos.

Vida adulta (PN178)			
FÊMEA	RM	CM	CM-H
<b>Gordura corporal (%)</b>	13.41 $\pm$ 0.8166	15.65 $\pm$ 1.130	16.31 $\pm$ 1.154
<b>Massa livre de gordura (%)</b>	68.65 $\pm$ 0.6705	66.38 $\pm$ 0.7569	66.08 $\pm$ 0.8540
<b>Fluido corporal (%)</b>	6.815 $\pm$ 0.08717	7.051 $\pm$ 0.1348	7.046 $\pm$ 0.1291
MACHO			
<b>Gordura corporal (%)</b>	14.78 $\pm$ 1.162	16.44 $\pm$ 0.8202	15.95 $\pm$ 0.8474
<b>Massa livre de gordura (%)</b>	67.85 $\pm$ 1.013	66.95 $\pm$ 0.6930	67.06 $\pm$ 0.7125
<b>Fluido corporal (%)</b>	7.524 $\pm$ 0.1221	7.651 $\pm$ 0.08955	7.604 $\pm$ 0.1178

Legenda: Grupos: RM – filhotes que receberam leite de rata, CM – filhotes que receberam leite de vaca, CM-H – filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico; PN: Dia pós-natal; Valores representados como  $\pm$  EPM de 16 – 20 ratos/grupo.

Fonte: A autora, 2017.

Aos 180 dias as fêmeas dos grupos CM apresentaram maior gordura visceral em comparação com o grupo RM (CM: + 61%; CM-H: + 60%;  $p < 0,05$ ; Tabela 12). As fêmeas do grupo CM-H também mostraram uma tendência para maior área de adipócitos do que o grupo RM (+ 29%;  $p < 0,1$ ; figura 12). Quanto à composição corporal avaliada pelo método da carcaça, nenhuma alteração foi detectada nas fêmeas de todos os grupos (Tabela 12). Diferente das fêmeas, os machos não apresentaram diferenças na massa de gordura visceral, no teor de gordura corporal ou na morfologia dos adipócitos viscerais entre os grupos. No entanto, os machos do grupo CM-H apresentaram menor teor de proteína corporal (vs CM: - 24%;  $p < 0,05$ ) e uma tendência para reduzir esse parâmetro quando comparado com o grupo RM (-23%;  $p < 0,1$ ) (Tabela 12).

Tabela 12 - Massa de gordura visceral e composição corporal pelo método da carcaça em ratos adultos.

<b>Vida adulta (PN180)</b>			
<b>FÊMEA</b>	<b>RM</b>	<b>CM</b>	<b>CM-H</b>
<b>TAB ret / massa corporal (mg)</b>	9.532 ± 0.6024	15.36 ± 1.273 *	15.26 ± 1.133 *
<b>Proteína corporal total (%)</b>	29.91±1.836	27.33±2.621	31.05±2.083
<b>Gordura corporal total (%)</b>	9.359 ±0.6770	11.30 ±1.125	10.25 ±1.504
<b>MACHO</b>			
<b>TAB ret / massa corporal (mg)</b>	18.92 ± 1.565	19.90 ± 1.448	19.90 ± 1.110
<b>Proteína corporal total (%)</b>	42.86 ± 1.748	43.60 ± 3.495	32.93 ±2.711 # *
<b>Gordura corporal total (%)</b>	9.590 ± 1.748	11.63 ± 3.495	10.89 ± 1.082

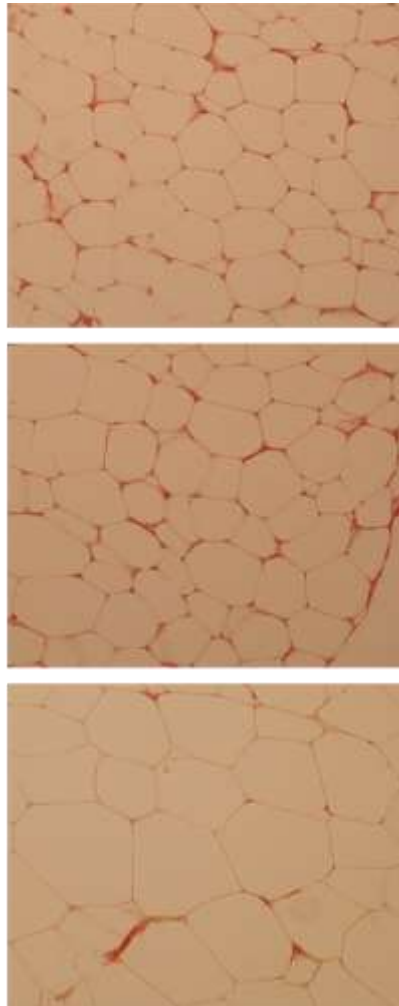
Legenda: Grupos: RM – filhotes que receberam leite de rata, CM – filhotes que receberam leite de vaca, CM-H – filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico. PN: Dia pós-natal; Valores representados como ± EPM de 7 – 10 ratos/grupo. Diferença significante entre os grupos: \* vs RM ( $p < 0,05$ ) / # vs CM ( $p < 0,05$ ); \* vs RM ( $p < 0,1$ ).

Fonte: A autora, 2017.

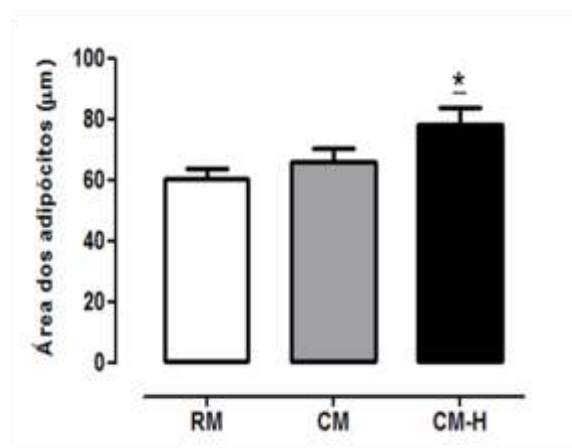


Figura 12 - Área dos adipócitos viscerais de fêmeas adultas que foram desmamadas precocemente.

(A)



(B)

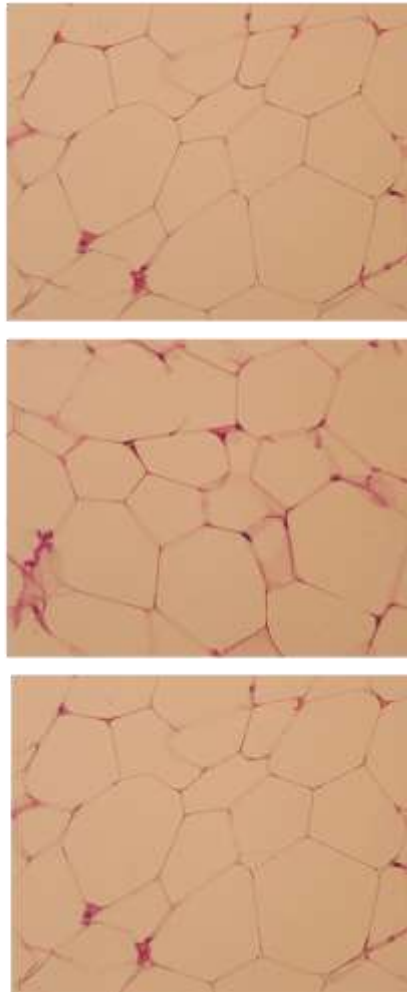


Legenda: (A) Amostras de gordura retroperitoneal submetidas ao processamento histológico e demonstradas como fotomicrografias com a mesma ampliação (objetivo de 40x) e coradas com hematoxilina-eosina (HE); (B) Quantificação do tamanho de adipócitos (gordura retroperitoneal) em fêmeas. Grupos: RM - filhotes que receberam leite de rato, CM - filhotes que receberam leite de vaca, CM - H - filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico. Os valores são dados como médias  $\pm$  SEM de 5-6 ratos / grupo. \* vs RM. (P < 0,1).

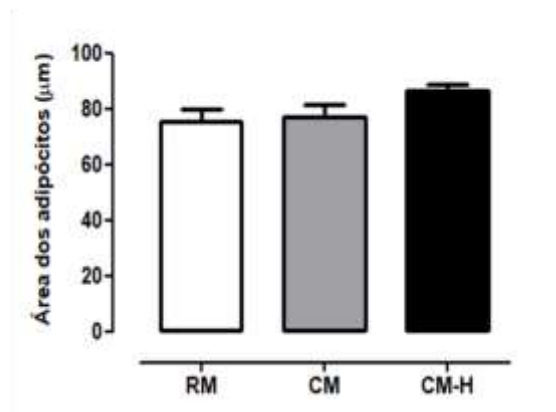
Fonte: A autora, 2017.

Figura 13 - Área dos adipócitos viscerais de fêmeas adultas que foram desmamadas precocemente.

(A)



(B)



Legenda: (A) Amostras de gordura retroperitoneal submetidas ao processamento histológico e demonstradas como fotomicrografias com a mesma ampliação (objetivo de 40x) e coradas com hematoxilina-eosina (HE); (B) Quantificação do tamanho de adipócitos (gordura retroperitoneal) nos homens Grupos: RM - filhotes que receberam leite de rato, CM - filhotes que receberam leite de vaca CM - H - filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico. Os valores são dados como médias  $\pm$  SEM de 5-6 ratos / grupo.

Fonte: A autora, 2017.

Em PN180 o perfil lipídico sérico e hepático, assim como a glicemia, permaneceram inalterados nos grupos em ambos os sexos (Tabelas 13 e 14).

As fêmeas do grupo CM-H apresentaram uma tendência para redução a insulina sérica (vs RM - 25%;  $p < 0,1$ ; Tabela 14) associada a glicemia inalterada e menor HOMA beta (vs RM -27%,  $p < 0,05$ ) e as fêmeas do grupo CM apresentaram uma tendência de redução do HOMA beta quando comparado com o grupo RM (-26%, Tabela 14). As fêmeas adultas não apresentaram alteração nos níveis séricos de corticosterona, enquanto os machos adultos no grupo CM apresentaram hipercorticosteronemia em comparação com outros grupos (+ 103% vs RM; + 120% vs CM-H;  $p < 0,05$ ; Tabela 14). No entanto, as concentrações de IGF-1, leptina e vitamina D não foram diferentes nos diferentes sexos.

Tabela 13 - Perfil Lipídico na vida adulta.

Vida adulta (PN180)				
FÊMEA		RM	CM	CM-H
SORO	<b>Colesterol total</b> (mg/dL)	69.81 ± 5.100	62.34 ± 4.585	71.93 ± 4.453
	<b>Triglicerídeos</b> (mg/dL)	126.3 ± 5.866	127.8 ± 4.503	125.0 ± 4.339
FÍGADO	<b>Colesterol total</b> (mg/dL)	1.421 ± 0.0269	1.361 ± 0.0326	1.399 ± 0.0320
	<b>Triglicerídeos</b> (mg/dL)	1.630 ± 0.0799	1.638 ± 0.0523	1.651 ± 0.0443
MACHO		RM	CM	CM-H
SORO	<b>Colesterol total</b> (mg/dL)	64.65 ± 4.940	57.53 ± 2.556	54.03 ± 2.198
	<b>Triglicerídeos</b> (mg/dL)	108.9 ± 9.051	117.5 ± 9.016	119.3 ± 11.33
FÍGADO	<b>Colesterol total</b> (mg/dL)	1.510 ± 0.0311	1.518 ± 0.0261	1.559 ± 0.0475
	<b>Triglicerídeos</b> (mg/dL)	1.789 ± 0.0752	1.831 ± 0.0581	1.812 ± 0.0393

Grupos: RM – filhotes que receberam leite de rata, CM – filhotes que receberam leite de vaca, CM-H – filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico. PN: Dia pós-natal; Valores representados como ± EPM de 8 – 11 ratos/grupo.

Fonte: A autora, 2017.

Tabela 14 - Homeostase glicêmica e perfil hormonal na vida adulta.

<b>Adulthood (PN180)</b>			
<b>FÊMEA</b>	<b>RM</b>	<b>CM</b>	<b>CM-H</b>
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	84.60 ± 2.513	87.44 ± 2.566	84.78 ± 3.122
<b>Insulina (uIU/mL)</b>	11.77 ± 0.5880	9.331 ± 1.189	8.872 ± 0.5982 *
<b>HOMA-IR</b>	2.459 ± 0.1509	2.028 ± 0.2863	1.868 ± 0.1662
<b>HOMA beta</b>	47.03 ± 2.996	34.94 ± 4.667 *	34.39 ± 5.542 *
<b>IGF-1 (pg/mL)</b>	655.7 ± 144.5	806.8 ± 97.40	871.8 ± 84.06
<b>Leptina (ng/mL)</b>	1.506 ± 0.2259	2.293 ± 0.1738	1.952 ± 0.2742
<b>Corticosterona (ng/mL)</b>	569.4 ± 85.97	557.1 ± 82.05	589.2 ± 79.15
<b>25(OH)D (ng/dL)</b>	25.6 ± 1.662	26.03 ± 2.678	23.06 ± 1.208
<b>MACHO</b>			
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	78.56 ± 3.56	76.60 ± 2.802	81.40 ± 2.061
<b>Insulina (uIU/mL)</b>	15.44 ± 2.286	12.24 ± 0.9299	12.55 ± 0.9690
<b>HOMA-IR</b>	3.078 ± 0.5450	2.345 ± 0.2398	2.495 ± 0.1817
<b>HOMA beta</b>	66.49 ± 9.246	54.01 ± 3.530	52.84 ± 4.820
<b>IGF-1 (pg/mL)</b>	1119 ± 123.7	1326 ± 107.2	913.6 ± 161.4
<b>Leptina (ng/mL)</b>	3.968 ± 1.097	3.561 ± 0.3413	3.767 ± 0.5861
<b>Corticosterona (ng/mL)</b>	401.2 ± 56.46	814.8 ± 44.95 * <sup>@</sup>	369.3 ± 38.73
<b>25(OH)D (ng/dL)</b>	13.84 ± 0.928	13.41 ± 1.593	14.76 ± 1.521

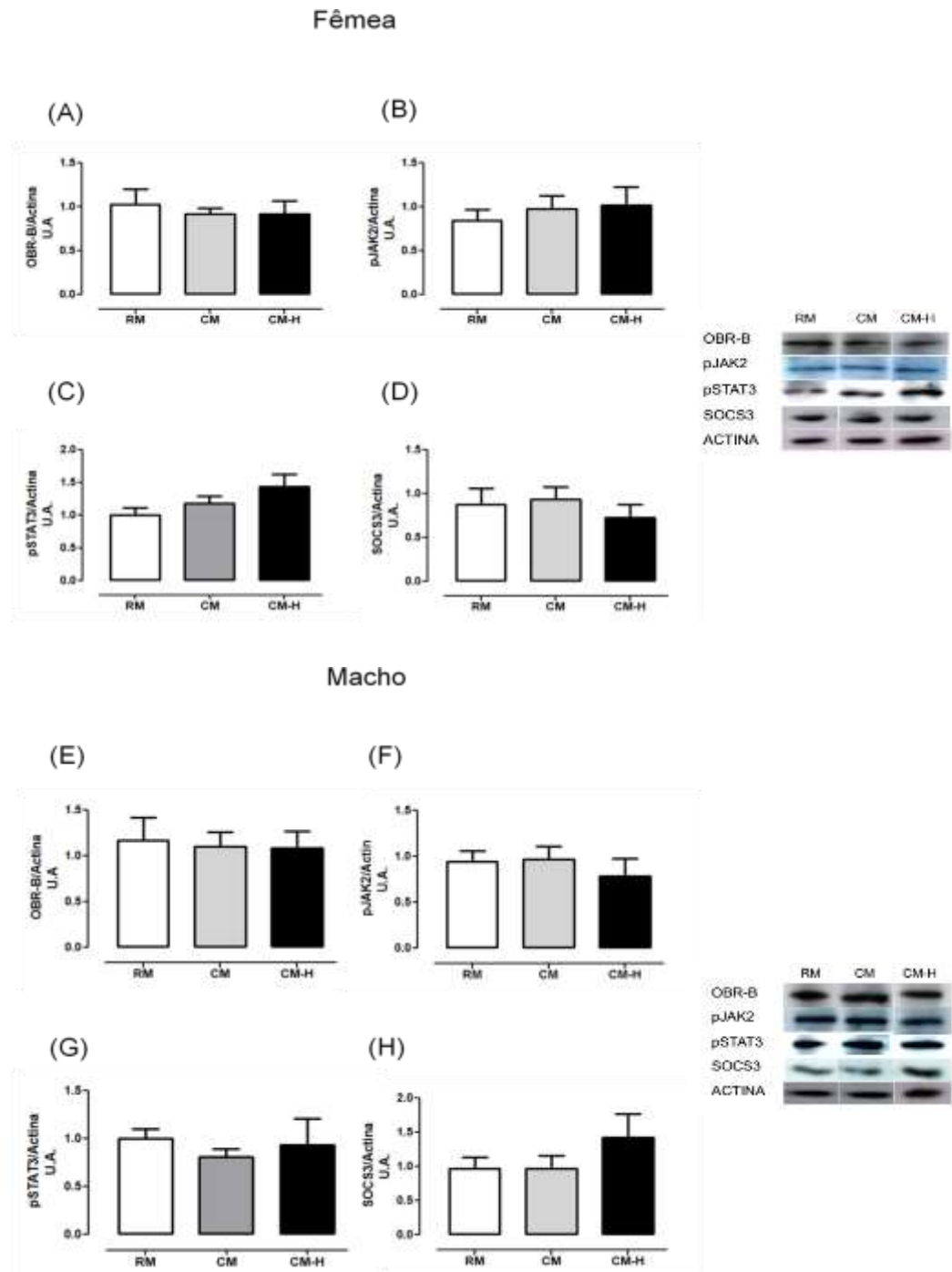
Grupos: RM – filhotes que receberam leite de rata, CM – filhotes que receberam leite de vaca, CM-H – filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico; PN: Dia pós-natal; HOMA-IR: Modelo de Avaliação da Homeostase – Resistência à insulina; HOMA- beta: Modelo de Avaliação da Homeostase – Capacidade funcional das células beta; IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina; Valores representados como ± EPM de 6 – 11 ratos/grupo. Diferença significativa entre os grupos: \* vs RM / @ vs CM-H (p<0.05); \* vs RM (p<0.1)

Fonte: A autora, 2017.

#### 4.4 Alterações moleculares

A via de sinalização de leptina no ARC das proles adultas é mostrada na Figura 8. Não foram encontradas alterações significativas no conteúdo da proteína OBR-b, pJAK2, pSTAT3 ou SOCS3 entre os grupos em ambos os sexos (Figura 14).

Figura 14 - Via de sinalização da leptina no núcleo arqueado do hipotálamo nas proles adultas que foram desmamadas precocemente em ambos os sexos.

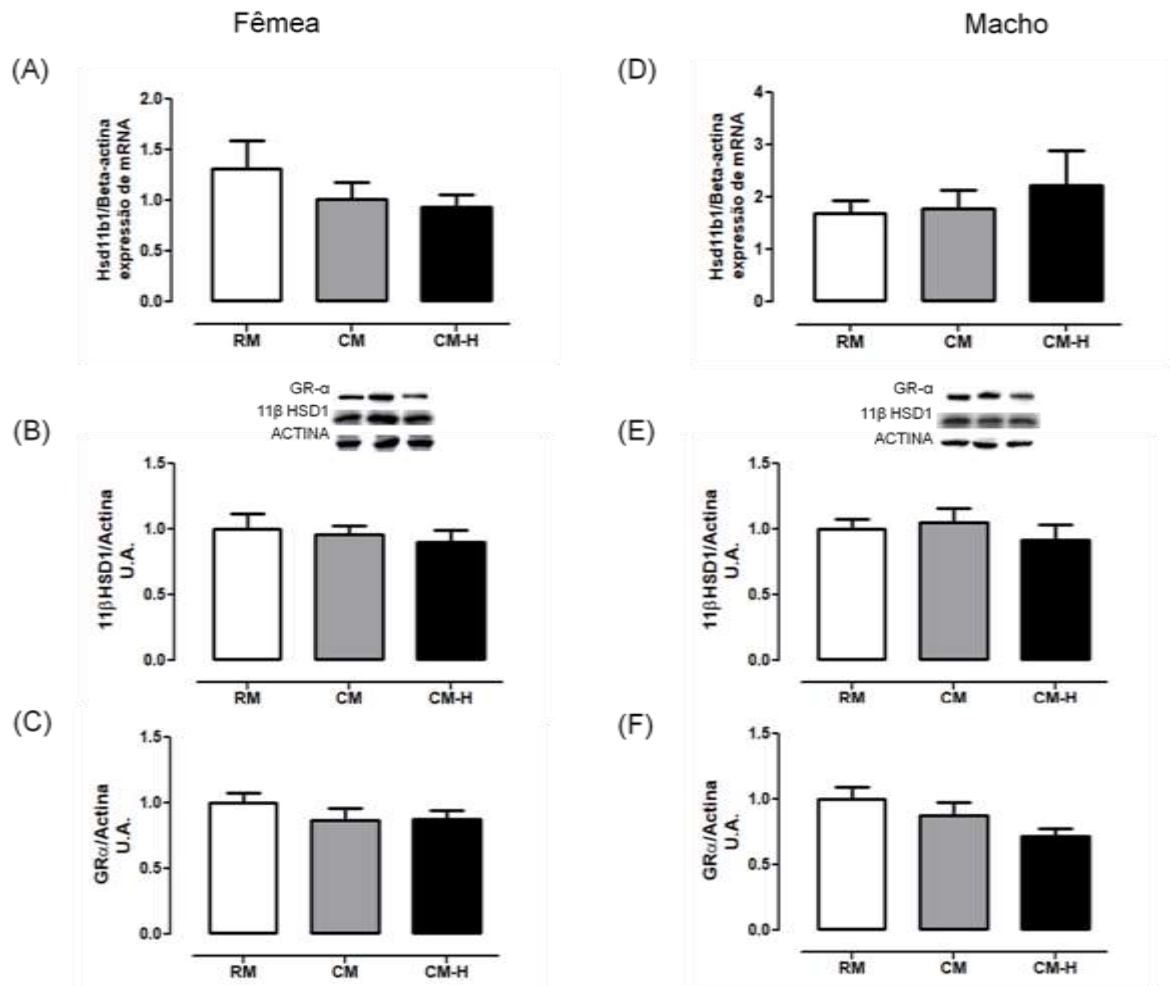


Legenda: Receptor de leptina (OBR-b; A: fêmea; E: macho); Janus Kinase 2 fosforilado (pJAK2; B: fêmea; F: masculino); Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 fosforilado (pSTAT3; C: fêmea; G: macho); Supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3; D: fêmea; H: macho). Grupos: RM - filhotes que receberam leite de rato, CM - filhotes que receberam leite de vaca, CM - H - filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico. Os valores são dados como médias  $\pm$  SEM de 6-10 ratos / grupo.

Fonte: A autora, 2017.

A conversão e / ou ação dos glicocorticoides estão representadas nas figuras 15 e 16. Nenhuma diferença foi observada no conteúdo de proteína 11 $\beta$ HSD1 ou GR $\alpha$  no fígado das fêmeas e machos em PN21 (Figuras 15B - 15C fêmeas, Figura 15E - machos 15F) e PN180 (Figuras 16B - fêmeas 16C, Figura 16E - 16F, machos). Ao desmame, a expressão de mRNA de 11 $\beta$ HSD1 na gordura visceral não foi alterada entre os grupos de ambos os sexos (Figura 15A, fêmea, Figura 15D, masculino). No entanto, na idade adulta, as fêmeas do grupo CM apresentaram menor expressão de 11 $\beta$ HSD1 em relação ao grupo RM (-58%;  $p < 0,05$ ), e o grupo CM-H apresentou uma tendência para a expressão reduzida da 11 $\beta$ HSD1 quando comparada com o grupo RM (- 39%;  $p < 0,1$ ) (Figura 16A). Os machos do grupo CM também apresentaram níveis reduzidos de mRNA da 11 $\beta$ HSD1 em comparação com o grupo CM-H (-80%,  $p < 0,05$ ; Figura 16D).

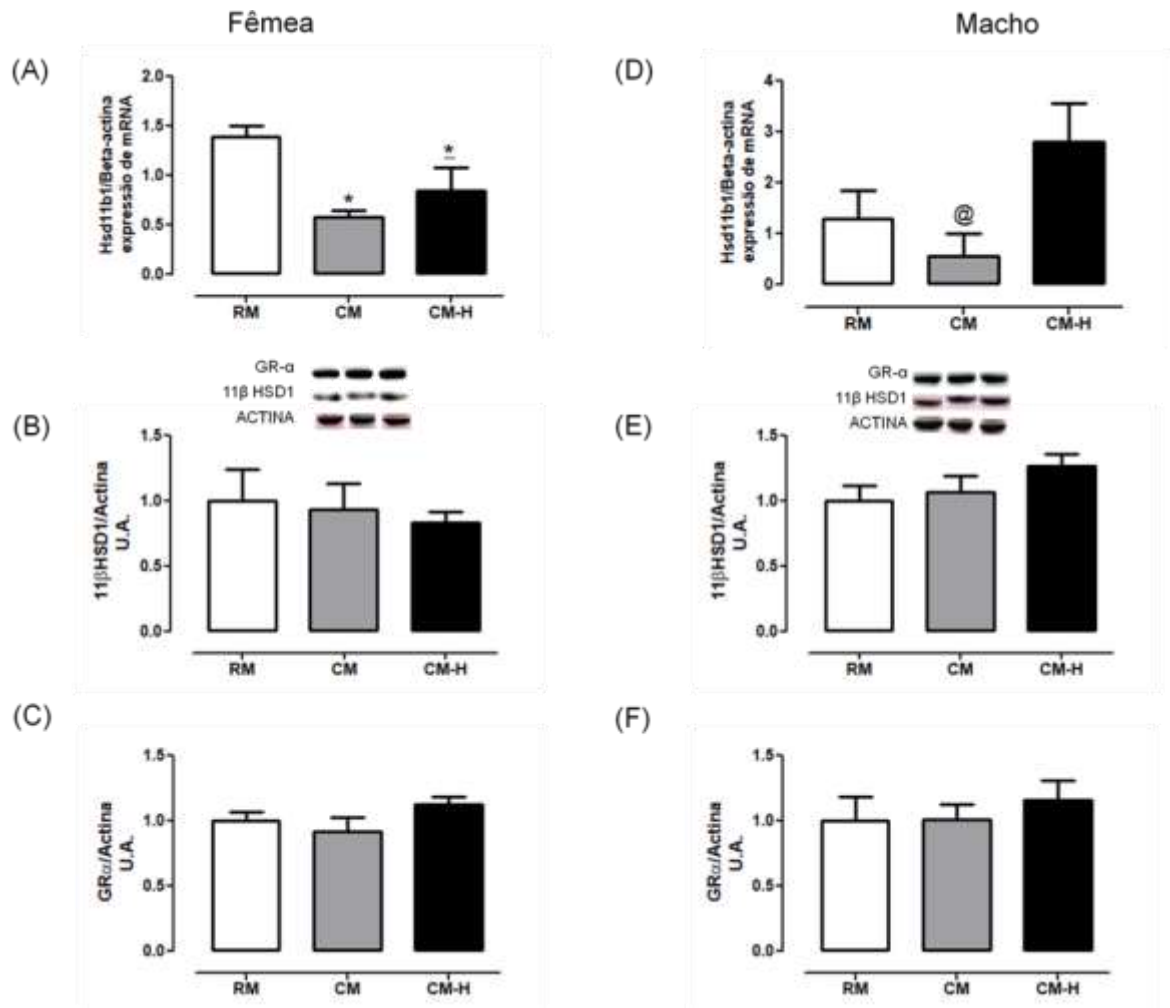
Figura 15 - Enzima de conversão e receptor de glicocorticoide das proles desmamadas precocemente em PN21.



Legenda: GORDURA VISCERAL: Expressão de mRNA da 11 beta hidroxisteroide desidrogenase tipo 1 (11βHSD1; A: fêmea; D: macho). Os valores são dados como médias ± SEM de 5-6 ratos / grupo. FÍGADO: Conteúdo proteico de 11 beta de hidroxisteroide desidrogenase tipo 1 de proteína (11βHSD1; B: fêmea; E: macho) e receptor de glicocorticoides (GR alfa; C: fêmea; F: macho); Os valores são dados como médias ± SEM de 6-10 ratos / grupo. Grupos: RM - filhotes que receberam leite de rato, CM - filhotes que receberam leite de vaca, CM – H - filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico

Fonte: A autora, 2017.

Figura 16 - Enzima de conversão e receptor de glicocorticoide das proles desmamadas precocemente em PN180.



Legenda: GORDURA VISCERAL: Expressão de mRNA da 11 beta hidroxisteroide desidrogenase tipo 1 (11βHSD1; A: fêmea; D: macho). Os valores são dados como médias ± SEM de 5-7 ratos / grupo. FÍGADO: Conteúdo proteico de 11 beta de hidroxisteroide desidrogenase tipo 1 (11βHSD1; B: fêmea; E: macho) e receptor de glicocorticoides (GR alfa; C: fêmea; F: macho); Os valores são dados como médias ± SEM de 6-10 ratos / grupo. Grupos: RM - filhotes que receberam leite de rato, CM - filhotes que receberam leite de vaca, CM - H - filhotes que receberam leite de vaca hiperproteico. \* vs RM, @ vs CM-H. (P <0,05); \* vs RM. (P <0,1)

Fonte: A autora, 2017.



## 5 DISCUSSÃO

Na literatura, ainda não há um consenso sobre a relação entre o consumo de leite de vaca e o desenvolvimento de distúrbios metabólicos (Turck et al, 2015). No entanto, alguns trabalhos mostram uma relação positiva entre o consumo de leite de vaca na infância (ou excesso de proteína láctea) e a ocorrência de obesidade futura (Günther et al, 2007; Koletzko et al, 2009). Neste sentido, o presente estudo contribui com esse tema ainda controverso através da avaliação das repercussões imediatas e tardias da complementação com leite de vaca para ratos Wistar no terço final da lactação, que constitui um modelo experimental de desmame precoce.

Através do perfil eletroforético de proteínas do leite, detectamos que o leite de rato apresenta maior conteúdo de proteínas solúveis e menor conteúdo de caseína em relação ao leite de vaca, perfil este que é similar ao leite humano. Contudo, o leite de rato é hiperproteico em comparação ao leite de vaca e este, por sua vez, é hiperproteico comparado ao humano. Assim, para mimetizar a suplementação de leite de vaca para humanos, oferecemos dois tipos de leite de vaca para os ratos Wistar, CM (hipoproteico) e CM-H (hiperproteico). Estes dois grupos mantiveram as características do leite de vaca, ou seja, maior conteúdo de caseína e menor conteúdo de proteína do soro. O grupo CM-H é o mais comparável ao observado em crianças que consomem uma mamadeira noturna de leite de vaca como complemento alimentar no período da amamentação, tornando seus resultados ainda mais importantes. A escolha pela complementação com leite de vaca apenas uma vez ao dia para ratos foi baseada em observações na prática clínica, onde é muito comum o hábito de oferecer uma mamadeira noturna de leite de vaca aos bebês para garantir saciedade à noite e um sono sem muitas interrupções.

Demonstramos que a ingestão de leite de outra espécie (vaca) com perfis diferentes de proteínas (menos proteínas solúveis e mais caseína) proporcionou, aos 21 dias de vida, redução de peso nas fêmeas do grupo CM e de adiposidade central nos machos do grupo CM, sem alterar o comprimento corporal, em ambos os sexos. Tais achados corroboram os resultados de dois modelos de desmame precoce que nosso grupo vem trabalhando há algum tempo, um farmacológico (Bonomo et al, 2008) e outro não farmacológico (Lima et al, 2013), nos quais os animais são privados do leite materno nos 3 últimos dias de lactação, e dessa forma, esses animais apresentam redução da adiposidade ao final da lactação. Podemos concluir que o menor aporte proteico do leite de vaca foi a causa das alterações observadas.

De fato, esses animais receberam leite de vaca, um alimento que apresenta um conteúdo proteico consideravelmente menor em relação ao leite de rata, sobretudo em sua porção solúvel, a fração que apresenta maior digestibilidade. Portanto, a ingestão calórica foi menor, mas o efeito sobre a nutrição foi gênero-dependente. Quanto a complementação com leite de vaca hiperproteico para ratos (grupo CM-H), não detectamos alteração de peso, comprimento e composição corporal em ambos os sexos aos 21 dias de vida, o que indica que a quantidade de proteína é o fator determinante para as alterações observadas no grupo CM.

Até o momento, poucos dados na literatura abordam o perfil lipídico de crianças amamentadas com leite de vaca. Harit et al (2007) mostraram que crianças, amamentadas exclusivamente, apresentaram colesterol total e LDL séricos mais elevados do que crianças em aleitamento misto (leite materno + leite de vaca) e os autores sugerem que essa condição seja fisiológica e útil para desenvolvimento cognitivo, além de ser um fator de programação para o metabolismo lipídico na vida adulta. Porém, no experimento atual não observamos quaisquer alterações dos lipídeos no soro e no fígado entre os grupos de ambos os sexos. Reforçando nosso dado, um estudo em ratos adultos que consumiram leite de vaca mostrou normocolesterolemia e normotrigliceridemia quando comparado ao grupo de ratos controles (sem uso de leite) (Trinchese et al, 2015). Assim, pelo menos no terço final da lactação, a ingestão de leite de vaca parece não interferir no perfil lipídico dos ratos lactentes.

Nuttall et al (1984) e Comerford e Pasin (2016) mostraram que peptídeos bioativos derivados de proteínas da carne e do leite, possuem ação insulínogênica, ou seja exercem efeitos benéficos sobre o controle da glicemia, secreção de insulina, sensibilidade a este hormônio, reduzindo o risco de desenvolver diabetes tipo 2. No presente estudo, os animais que consumiram leite de vaca enriquecido ou não com caseína não apresentaram alteração de glicemia e insulinemia no período do desmame. Esse fato pode se dever ao tipo de fração protéica (insolúvel) utilizada em nosso estudo, pois Hopp et al (2009) observaram em adolescentes, que apenas a fração proteica solúvel do leite (whey protein) aumentou a insulinemia.

Atualmente tem sido postulado que o consumo excessivo de proteína (Rolland-cachera et al, 1995; Michaelse, 2000), inclusive proteína láctea (Hoop et al 2009), pode elevar os níveis de IGF-1 e, conseqüentemente, levar ao aumento de peso, uma vez que este hormônio anabólico estimula a diferenciação celular e o crescimento dos tecidos, como o tecido adiposo. Closa-Monasterolo et al (2011) mostraram que a administração de fórmula láctea hiperproteica em crianças, aumentou os níveis de IGF-1 e que as meninas, independente da fórmula, apresentaram maior IGF-1 que os meninos, sugerindo que, na infância, já existe

dimorfismo sexual para este hormônio. No entanto, no estudo atual não observamos diferença de IGF-1 ao desmame nos grupos que receberam leite vaca, independente da concentração de proteína, em ambos os sexos.

Alguns pesquisadores têm sugerido que os níveis séricos de leptina podem estar aumentados em crianças alimentadas com fórmula infantil e que esse aumento se deve a algum componente presente na fórmula láctea, porém ainda não definido (Lopez-Alarcon et al, 2002; Petridou et al, 2005). Nessa perspectiva, avaliamos a leptina para verificar se o leite de vaca poderia alterar os seus níveis séricos. Nenhuma modificação foi observada entre os grupos ou gêneros. A leptina sérica tem relação direta com a quantidade de tecido adiposo (Klok, 2007), contudo os filhotes machos do grupo CM, que têm menor adiposidade central, não tiveram hipoleptinemia. Assim sugerimos duas explicações para a normoleptinemia encontrada em comparação com a literatura: 1) utilização de um alimento diferente (fórmula láctea x leite de vaca) e/ou 2) cada espécie pode responder de forma diferente a complementação alimentar (humano/fórmula láctea vs. rato/leite de vaca).

Como o leite próprio de cada espécie apresenta melhor biodisponibilidade de seus nutrientes para sua prole, decidimos avaliar os níveis séricos de vitamina D nas proles. Contudo, nenhuma diferença foi observada entre os grupos de ambos os sexos, demonstrando que a adição de leite de vaca na lactação, não foi capaz de alterar os níveis dessa vitamina.

Neste trabalho, a única alteração hormonal observada aos 21 dias de idade nos filhotes machos que receberam complementação com leite de vaca hiperproteico foi em relação as concentrações circulantes de corticosterona. Alterações deste hormônio podem ocorrer devido a hiper ou hipoestimulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e/ou por alterações nos e no metabolismo em órgãos periféricos, como fígado e tecido adiposo, através da enzima 11 $\beta$  HSD1 (Bose et al, 2009). Apenas os machos do grupo CM-H apresentaram hipercorticosteronemia, sem apresentarem alteração da expressão da 11 $\beta$  HSD1 no tecido adiposo visceral ou do conteúdo da 11 $\beta$  HSD1 e do GR $\alpha$  no fígado. Sugerimos que o aumento de corticosterona sérica nestes animais seja proveniente da maior produção e liberação do córtex adrenal devido a uma hiperestimulação do eixo HPA. Para comprovar esta ideia, será necessário medir os níveis séricos de ACTH e o conteúdo hipotalâmico de CRH. Sabe-se que a dexametasona, um corticóide sintético, diminui os níveis de IGF-I e IGF-II no cérebro de ratos neonatos, causando degeneração cerebral (Feng et al, 2013). Assim, esta pode ser uma consequência da hipercorticosteronemia neste grupo de animais.

A caseína é composta por vários peptídeos bioativos com atividade agonista e/ou antagonista opióide (Guesdonet al 2006). Estudos reportaram a presença de casomorfina no

plasma de mamíferos lactentes após ingestão de leite de vaca ou hidrolisado de caseína (Meisel e Fitz Gerald, 2000). Szklarczyk et al. (2016) observaram que a administração intracerebroventricular de antagonista  $\mu$ -opióide antes de um estresse foi capaz de aumentar a corticosterona sérica, mostrando que esses receptores exercem influência sobre o eixo HPA. Portanto, também é possível que o aumento da corticosterona sérica nos machos do grupo CM-H seja decorrente da passagem dos opióides exógenos com efeito antagonista ( $\alpha_B$  – caseína e casoxina) pela barreira intestinal ainda imatura desses animais, estimulando o eixo HPA. No entanto, os mecanismos acima descritos não explicam todos os grupos, pois os machos e fêmeas que consumiram leite de vaca apresentaram um aumento não significativo da corticosteronemia (macho CM macho=+21%; fêmeas CM=+28%; fêmea CM-H=+41%). Sugerimos que a concentração de caseína que passa pelo leite seja o fator preponderante para estimular o eixo HPA.

Diferente do descrito na literatura, logo após o desmame, os animais machos dos grupos CM e CM-H, e as fêmeas CM-H apresentaram menor comprimento de PN 30 a PN60. Esta fase é crítica para o desenvolvimento, pois engloba o período da adolescência (Kane & Ismail, 2017). Em crianças, Koletzko et al (2009) verificaram que formulas lácteas ricas em proteínas resultam em aumento de massa e comprimento corporal a longo prazo, bem como das relações entre essas medidas (IMC, relação peso-comprimento, relação comprimento-idade). Como não quantificamos os hormônios relacionados ao crescimento nesta fase da vida, não sabemos o mecanismo pelo qual este crescimento foi prejudicado. Entretanto, houve um *catch up* após os 60 dias, não havendo mais diferenças entre os grupos.

Evidenciamos que a inclusão do leite de vaca em ratos lactentes programa para um fenótipo alterado leve na vida adulta, porém de considerável importância. Tanto os machos quanto as fêmeas não apresentaram alteração no perfil lipídico e no IGF-1 na vida adulta, indicando que o desmame precoce gerado pela introdução de leite não foi capaz de programar esses parâmetros em ambos os sexos. Porém, esse modelo de programação exibiu dimorfismo sexual para alguns parâmetros analisados. Investigamos alguns hormônios para tentar compreender o fenótipo obeso das fêmeas no presente estudo e que será discutido mais adiante. De fato, glicocorticóides, leptina, insulina e vitamina D são hormônios que modulam os processos de adipogênese, lipogênese e lipólise (Unger, 2003; Peckett et al, 2011; García-Escobar et al, 2011; Abbas, 2017).

Embora tenhamos trabalhado com um modelo de desmame precoce uma vez que um alimento diferente do leite materno foi introduzido, os machos CM não apresentaram o esperado aumento da adiposidade, resultado contrário ao observado nos outros dois modelos

de desmame precoce desenvolvidos pelo grupo (Bonomo et al, 2008; Lima et al, 2013). Essa diferença nos resultados talvez se deva a diferença metodológica aplicada, pois no presente trabalho os animais CM ficaram expostos a um alimento hipoprotéico durante 7 dias enquanto que nos outros trabalhos houve uma redução drástica (desmame farmacológico) ou ausência (desmame não farmacológico) do aporte de leite nos últimos 3 dias da lactação. Assim, a deficiência proteica provocada pelo leite de vaca de forma crônica em ratos machos não foi capaz de programar para obesidade, provavelmente pela menor intensidade do desmame propiciando um mecanismo adaptativo nesses animais. Já os machos do grupo CM-H apresentaram apenas redução da proteína corporal total que pode ter ocorrido devido a hipercorticosteronemia no início da vida. Os efeitos catabólicos dos glicocorticóides já estão bem estabelecidos; diminuição da síntese proteica e aumento da degradação das proteínas (Lofberg et al, 2002). O excesso de corticóides no início da vida pode ter levado a um aumento da degradação de proteínas a longo prazo. Esse efeito não foi observado aos 21 dias, possivelmente devido ao fato dos animais do grupo CM-H ainda estarem sob o efeito da alta quantidade de proteína. Portanto, a exposição prolongada ao corticóide tenha aumentado a degradação proteica por um período, levando a redução de proteína corporal e esses animais não conseguiram se recuperar até a idade adulta. É importante ressaltar que não sabemos até quando permanece o aumento de corticosterona do momento do desmame, embora na idade adulta, este nível seja normal.

Os machos do grupo CM que receberam um leite hipoproteico no terço final da lactação, apesar da normocorticosteronemia ao desmame, apresentaram hipercorticosteronemia aos 180 dias de vida. De fato, Fagundes et al (2009) demonstraram que animais que sofreram restrição proteica na lactação apresentaram hipercorticosteronemia na vida adulta. Para entendermos o mecanismo que está influenciando a corticosteronemia, avaliamos o metabolismo e a ação dos glicocorticóides. Não foram observadas alterações no conteúdo da 11 $\beta$ HSD1 e do GR $\alpha$  no fígado, contudo a expressão da 11 $\beta$ HSD1 no tecido adiposo visceral do grupo CM foi reduzida, indicando que exista uma regulação da sua conversão pelo excesso de corticosterona e não sendo a causa da hipercorticosteronemia. Na literatura há controvérsias em relação à expressão da 11 $\beta$  HSD1 frente ao excesso de glicocorticóide. Balachandran et al (2008) observaram que a administração de dexametasona, cortisol e corticosterona em células 3T3-L1 reduziu o RNAm de 11 $\beta$ HSD1, porém no tecido adiposo visceral de camundongos, houve aumento na expressão dessa enzima causada pelo corticóide. Pacientes com Cushing não tiveram aumento da 11 $\beta$ HSD1 no tecido adiposo visceral, mas indivíduos obesos apresentaram aumento desta enzima (Mariniello et al, 2006).

Alem disto, recentemente foi evidenciado menor expressão da 11 $\beta$ HSD1 no hipotálamo de camundongos tratados com altas doses de corticosterona (Sefton et al. 2016). As fêmeas, mesmo não apresentando alteração na corticosteronemia, também tiveram o metabolismo e ação dos glicocorticóides investigados, e assim como os machos, não apresentaram alteração no conteúdo da 11 $\beta$  HSD1 e do GR $\alpha$  no fígado. Entretanto, no tecido adiposo visceral, as fêmeas do grupo CM e CM-H apresentaram menor expressão da 11 $\beta$ HSD1, sugerindo que outros mecanismos estejam modulando a atividade dessa enzima neste tecido. Estudos mostram que a hipóxia no tecido adiposo de obesos ocorre em decorrência de sua expansão não acompanhado pelo aumento proporcional de sua vascularização (Hosogai et al, 2007). A hipóxia neste tecido estimula a vários processos mediados por citocinas, fatores de crescimento, além de fatores de transcrição, como o fator induzido pela hipoxia 1 (HIF-1), que estimula a eritropoiese e angiogênese (Norooznezhad e Norooznezhad, 2017; Hosogai et al, 2007 ). De fato, Lee et al (2013) mostraram que nos estágios iniciais da obesidade ocorre um aumento de HIF-1 que inibe a expressão da 11 $\beta$ HSD1. Estudos mostraram que os glicocorticóides são inibidores da angiogênese, pois eles alteram a liberação de fatores pró-angiogênicos (Small et al 2005; Weinstein et al, 2010; Wu et al, 2014). Desta forma, a modulação negativa da 11 $\beta$ HSD1 é necessária para reduzir os níveis de glicocorticóides locais e favorecer o aumento dos fatores pró-angiogênicos. Sugerimos que a redução da 11 $\beta$ HSD1 nas fêmeas dos grupos que receberam leite de vaca e que possuem adiposidade central elevada seja resultado do aumento dos fatores de crescimento, por exemplo o HIF-1, favorecendo a angiogênese e o aumento do tecido adiposo. Esta hipótese é válida para explicar a diminuição de 11 $\beta$ HSD1 apenas nas fêmeas.

Neste trabalho, as fêmeas apresentaram um fenótipo de programação mais intenso do que os machos. Como não verificamos alteração do seu ciclo estral, sugerimos que o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas esteja inalterado. Assim é possível que os efeitos gênero-dependentes se devam a resposta tecido-específico ao estrogênio.

Em ratos machos adultos que foram desmamados precocemente, foi mostrado uma associação entre obesidade visceral, altos níveis séricos de vitamina D e resistência a este hormônio no tecido adiposo (Nobre et al, 2012, de Albuquerque Maia et al, 2014; Nobre et al, 2016). Em nosso estudo, ratos adultos de ambos os gêneros que foram desmamados pela introdução do leite de vaca não apresentaram diferenças dos níveis séricos de 25(OH)D. Este resultado foi inesperado, principalmente nas fêmeas CM e CM-H que foram programadas para obesidade visceral. Todavia, não sabemos como se encontra a resposta do tecido adiposo a este hormônio.

As fêmeas dos grupos CM e CM-H desenvolveram hiperfagia, sem apresentar alteração nos níveis séricos de leptina, sugerindo uma resistência ao seu efeito anorexigênico. Rodrigues et al (2009) e Conceição et al (2010) também evidenciaram hiperfagia com normoleptinemia em animais submetidos a supernutrição neonatal, porém com inibição da via de sinalização da leptina no hipotálamo. No atual modelo, nenhuma alteração foi observada na via clássica da leptina JAK2/STAT3 no núcleo arqueado do hipotálamo. Assim, a hiperfagia das fêmeas deve se dever a outros fatores como: prejuízo no transporte de leptina pela barreira hemato-encefálica (El-Haschimi et al, 2000) e/ou inibição da via de sinalização não clássica da leptina, envolvendo a PI3K e a PDK1 (Ernst et al, 2009; Carvalheira et al 2004). Assim, na resistência a leptina, a não ativação da PI3K, leva a fosforilação ineficiente de FOXO1, acarretando menor expressão de POMC e aumentando a ingestão alimentar. Com a PI3K reduzida, outra possibilidade é a redução da proteína PDK1, inibindo a AKT (Carvalheira et al 2004). Outro hormônio importante na regulação da ingestão alimentar é a insulina que, semelhante a leptina, tem efeito anorexigênico no hipotálamo. Assim, a hipoinsulinemia detectada nas fêmeas pode estar causando menor ativação da PI3K, via em comum com a leptina, o que explicaria a hiperfagia. A determinação das proteínas envolvidas nas vias da leptina e da insulina nos ajudaria a elucidar as alterações associadas da hiperfagia.

Outra disfunção apresentada pelas fêmeas CM e CM-H aos 180 dias de idade foi à redução do HOMA beta com normoglicemia. Ou seja, mesmo com a redução da insulinemia, essas ratas conseguem manter os níveis glicêmicos dentro da normalidade, indicando que o tecido adiposo e músculo apresentam uma sensibilidade aumentada a insulina, pois estão captando glicose de forma mais eficiente. De fato, HOMA-IR foi menor nos grupos CM e CM-H (25% e 32%) embora não significativamente. Ao menos no tecido adiposo, de fato deve ocorrer maior sensibilidade, pois essas fêmeas apresentam redução na expressão da 11 $\beta$ HSD1, e de acordo com Masuzaki et al (2001), a inibição farmacológica desta enzima melhora a sensibilidade insulínica em humano. Giust et al (2003) também sugeriram que a redução da expressão de 11 $\beta$ -HSD1 nos adipócitos aumenta a sensibilidade insulínica, quer seja pela redução de genes induzidos pelos glicocorticóides ou pela redução da secreção dos glicocorticóides. Por outro lado, a redução da insulinemia pode ser explicada pela redução da funcionalidade das células  $\beta$  do pâncreas, pois o menor HOMA beta sugere um processo de falência dessas células. Esse fenômeno também pode ser resultado da redução da ação do estrogênio. O estrogênio é importante para o funcionamento das células  $\beta$  pancreáticas, protegendo estas de apoptose, estresse oxidativo, glicolipototoxicidade e deposição de amilóide (Liu e Mauvais-Jarvis, 2010). Tiano e Mauvais-Jarvis (2012) observaram que o tratamento

com estrogênio em ratos obesos e diabéticos normalizou a homeostase glicêmica desses animais. Assim, a redução do HOMA beta nas fêmeas CM e CM-H pode ser resultado da falência das células  $\beta$  pancreáticas que produz menos insulina, tornando-as mais suscetíveis ao desenvolvimento de diabetes tipo 1. O mesmo raciocínio pode ser inferido para alterações na prolactinemia destas fêmeas, já que a prolactina é um hormônio importante para o desenvolvimento das células beta pancreáticas (Boschero et al, 1993; Crepaldi et al, 1997; Sorenson e Brelje, 2009). De fato, nos dois modelos de desmame precoce estudados em nosso laboratório (farmacológico ou não), observamos menor prolactinemia na idade adulta (Moura et al, 2009; Lima et al, 2011), porém isto foi estudado somente nos machos.

Neste estudo, apenas as fêmeas que receberam aleitamento parcial (uma forma de desmame precoce) apresentaram aumento de adiposidade central, indicando existir alguma relação gênero-dependente. O estrogênio regula a homeostase do tecido adiposo, porém o mecanismo ainda não é claro (Newell-Fugate, 2017). Ratas ovariectomizadas desenvolvem obesidade, com aumento de adiposidade visceral e hiperfagia (Wade e Grey, 1979). A menopausa, um período caracterizado pela cessação dos hormônios ovarianos, também é conhecida por afetar a gordura corporal total e a distribuição de gordura (Zsakai, et al, 2016). Assim, o aumento da adiposidade central das fêmeas dos grupos CM, CM-He a hipertrofia das fêmeas do grupo CM-H podem se dever a redução da ação do estrogênio no tecido adiposo visceral, tornando-as desprotegidas contra a obesidade e mais propensas a desenvolver distúrbios metabólicos, mesmo que os níveis séricos de estrogênio estejam normais, pois o ciclo estral foi regular. Uma forma de comprovar esta ideia seria avaliar o receptor de estrogênio no tecido adiposo.

Em suma, nosso estudo mostrou que o desmame precoce provocado por uma complementação diária com leite de vaca hiperproteico ou não, imprimiu alterações metabólicas em curto prazo e longo prazo, de maneira gênero dependente. Portanto, este achado mostra que o consumo precoce de leite de vaca está relacionado ao desenvolvimento de obesidade central na vida adulta, considerado um fator de risco para a gênese de doenças cardiometabólicas, pelo menos no sexo feminino. Ademais, ressaltamos a importância do aleitamento materno exclusivo até o sexto mês como uma forma de proteção para crianças contra o desenvolvimento de doenças futuras.



## CONCLUSÃO

A substituição da amamentação exclusiva pelo aleitamento parcial, com a inclusão de leite de vaca enriquecido ou não de caseína no terço final da lactação foi capaz de imprimir alterações metabólicas, que afetaram mais gravemente as fêmeas, apesar de também impactarem nos machos. Esse trabalho mostrou que intervenções no início da vida contribuem para o desenvolvimento da obesidade visceral, principalmente no sexo feminino. Reforçando nossos achados, dados epidemiológicos no Brasil e no mundo mostram que a obesidade abdominal é mais frequente em mulheres que em homens (IBGE, 2015; NCD-RisC, 2016). Assim, concluímos que o aleitamento materno exclusivo deve ser cada vez mais estimulado, pois ele ainda é a melhor forma de nutrir e proteger as crianças de problemas de saúde tanto imediatos quanto futuros.

## REFERÊNCIAS

- Abbas MA. Physiological functions of Vitamin D in adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017 Jan;165(Pt B):369-381.
- Abella V, Scotece M, Conde J, Pino J, Gonzalez-Gay MA, Gómez-Reino JJ, Mera A, Lago F, Gómez R1, Gualillo O. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat Rev Rheumatol.* 2017 Feb;13(2):100-109.
- Addati L, Cassirer N, Gilchrist K. Maternity and paternity at work : law and practice across the world International Labour Office, – Geneva: ILO, 2014. Disponível em: [http://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---dgreports/---dcomm/---publ/documents/publication/wcms\\_242615.pdf](http://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---dgreports/---dcomm/---publ/documents/publication/wcms_242615.pdf). Acesso em: 28 dez.2016.
- Adiloğlu AK; Gönülateş N; İşler M; Senol A. The effect of kefir consumption on human immune system: a cytokine study. *Mikrobiyol Bul.* 2013 Apr;47(2):273-81
- Almeida JAG, Novak FR. Amamentação: um híbrido natureza-cultura. *J Pediatr.*, v. 80, n. 5, 2004.
- American Academy of Pediatrics - Breastfeeding and the Use of Human Milk. *PEDIATRICS* Vol. 115 No. 2 February 2005. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/115/2/496>>. Acesso em: 28 dez 2016.
- Arifeen S, Black RE, Antelman G, Gaqui A, Caulfield Becker S. Exclusive breastfeeding reduces acute respiratory disease and diarrhea deaths among infants in Dhaka slums. *Pediatrics* 2001; 108(4):E67.
- Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010 / ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. - 3.ed. - Itapevi, SP : AC Farmacêutica, 2009.
- Balachandran A, Guan H, Sellan M, van Uum S, Yang K. Insulin and dexamethasone dynamically regulate adipocyte 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology.* 2008 Aug;149(8):4069-79.
- Bárbara Helena de Brito Ângelo. Apoio à amamentação: influência da avó materna, Dissertação, 31-01-14, Recife 2014, Universidade Federal de Pernambuco. Acesso em: 28/12/2016 Disponível em: <https://www.ufpe.br/ppgenfermagem/images/barbara.pdf>
- Barbosa MB, Palma D, Bataglin T, Taddei JAAC. Custo da alimentação no primeiro ano de vida. *Rev. Nutr.* vol.20 no.1 Campinas Jan./Feb. 2007.
- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet.* 1993 Apr 10;341(8850):938-41. Review.

Barquissau V, Ghandour RA, Ailhaud G, Klingenspor M, Langin D, Amri EZ, Pisani DF. Control of adipogenesis by oxylipins, GPCRs and PPARs. *Biochimie*. 2016 Dec 27. pii: S0300-9084(16)30317-0.

Baudrand R, Vaidya A. Cortisol dysregulation in obesity-related metabolic disorders. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2015;22(3):143–149.

Baum, F; Fedorova, M; Ebner, J; Hoffmann, R; Pischetsrieder, M. Analysis of the Endogenous Peptide Profile of Milk: Identification of 248 Mainly Casein-Derived Peptides, *J, Proteome Res*, 2013, 12, 5447–5462.

Bhansali A, Velayutham P, Sialy R, Sethi B. Effect of opiates on growth hormone secretion in acromegaly. *Horm Metab Res*. 2005 Jul;37(7):425-7.

Bjorbaek C1, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem*. 1999 Oct 15;274(42):30059-65.

Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MC, Alves SB, Reis AM, de Moura EG. Prolactin inhibition at the end of lactation programs for a central hypothyroidism in adult rat. *J Endocrinol*. 2008 Aug;198(2):331-7. doi: 10.1677/JOE-07-0505.

Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MC, Pazos-Moura CC, Reis AM, Moura EG. Prolactin inhibition in lactating rats changes leptin transfer through the milk. *Horm Metab Res*. 2005 Apr;37(4):220-5.

Bonomo IT, Lisboa PC, Pereira AR, Passos MC, de Moura EG. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *J Endocrinol*. 2007 Feb;192(2):339-44.

Bortolini GA, Vitolo MR, Gubert MB, Santos LM, Early cow's Milk consumption among brazilian children results of a national survey, *J Pediatr (Rio J)*, 2013 Nov-Dec;89(6):608-13.  
 Boschero AC, Crepaldi SC, Carneiro EM, Delattre E, Atwater I. Prolactin induces maturation of glucose sensing mechanisms in cultured neonatal rat islets. *Endocrinology*. 1993 Aug;133(2):515-20.

Bose M, Oliván B, Laferrère B. Stress and obesity: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in metabolic disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009 Oct;16(5):340-6.

BRASIL, Lei 11.770, publicada em 9 de setembro de 2008. Cria o Programa Empresa Cidadã, destinado à prorrogação da licença-maternidade mediante concessão de incentivo fiscal, e altera a Lei no 8.212, de 24 de julho de 1991.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Programa de Assistência Integral à Saúde da Criança,: Aleitamento Materno e Orientação Alimentar para o Desmame , Instituto de Assistência Médica da Previdência Social - INAMPS, 3ª ed, 1986, p, 03-22.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Conselho Nacional de Saúde, Resolução no 5, de 20 de dezembro de 1988, Normas de comercialização de alimentos para lactentes (NBCAL). Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 dez, 1988.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Guia alimentar para crianças menores de 2 anos / Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde, – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005, 152p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição-INAN, Secretaria de Programas Especiais-SPE, Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno-PNIAM, Normas Gerais para Bancos de Leite Humano, Brasília, Ministério da Saúde, 1993, 20 p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria no 2051, de 8 de novembro de 2001, Norma brasileira de comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância: bicos, chupetas e mamadeiras (NBCAL), Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 nov, 2001.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas, II pesquisa de prevalência de aleitamento materno nas capitais brasileiras e distrito federal, Brasília – DF, 2009.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas, Cartilha para a mãe trabalhadora que amamenta / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas, – Brasília : Ministério da Saúde, 2010, 23 p. : il, – (Série F, Comunicação e Educação em Saúde).

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. VIGITEL. Abril 2014. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/uploads/downloads/80/553a243c4b9f3.pdf>> Acesso em: 14 jan. 2017

BRASIL. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Pesquisa nacional de saúde : 2013 : ciclos de vida : Brasil e grandes regiões / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro : IBGE, 2015. 92 p. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/uploads/downloads/101/59496b5633873.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2017

Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Differentiation of Adipose Stromal Cells: The Roles of Glucocorticoids and 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase, *Endocrinology*. 1999; 140:3188–96  
Bullo M, Casas-Agustench P, Migo-Correig P, Aranceta J, Salas Salvado J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutr*. 2007; 10(10A):1164-72.

Burgess ED, Hawkins RG, Watanabe M. Interaction of 1,25-dihydroxyvitamin D and plasma renin activity in high renin essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1990 Dec; 3(12 Pt 1):903-5.

Buzinaro EF; Almeida RNA; Mazeto GMFS. Biodisponibilidade do cálcio dietético. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.50 no.5 São Paulo Oct. 2006.

Cade R, Privette R, Fregly M, Rowland N, Sun Z, Zele V, et al. Autism and schizophrenia: intestinal disorders. *Nutr Neurosci* 2000;3:57–72.

Cadogan J, Eastell R, Jones N, Barker ME. Milk intake and bone mineral acquisition in adolescent girls: randomised, controlled intervention trial. *BMJ*. 1997 Nov 15;315(7118):1255-60.

Calil VMLT, Falcão MC. Composição do leite humano: o alimento ideal. *Rev Med (São Paulo)* 2003 jan.-dez.;82(1-4):1-10.

Calil VMLT, Leone CR, Ramos JLA. Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II - Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca\*. *Rev. Pediatria, São Paulo*, 1991.

Calil VMLT, Leone CR, Ramos JLA. Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional, II – Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação, Vantagens em relação ao leite de vaca, *Pediatria (São Paulo)* 1992;14:14-23.

Carvalho JB, Torsoni MA, Ueno M, Amaral ME, Araújo EP, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ. Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. *Obes Res*. 2005 Jan;13(1):48-57.

Castilho SD, Barros Filho AA. Alimentos utilizados ao longo da história para nutrir lactentes, *J Pediatr (Rio J)*, 2010;86(3):179-188.

Cavalcanti LPG, Diniz RLP, Araujo BQ, Soares AKM, Feitosa GP, Machado JRM et al. Fatores associados ao consumo precoce de leite de vaca integral por crianças menores de um ano de idade. *Rev Bras Promoç Saúde(Fortaleza)* 28(4): 538-546, out/dez. 2015.

Cederquist CT, Lentucci C, Martinez-Calejman C, Hayashi V, Orofino J1, Guertin D, Fried SK, Lee MJ, Cardamone MD, Perissi V. Systemic insulin sensitivity is regulated by GPS2 inhibition of AKT ubiquitination and activation in adipose tissue. *Mol Metab*. 2016 Oct 31;6(1):125-137.

Chen L, Chen Q, Xie B, Quan C, Sheng Y, Zhu S, Rong P, Zhou S, Sakamoto K, MacKintosh C, Wang HY, Chen S. Disruption of the AMPK-TBC1D1 nexus increases lipogenic gene expression and causes obesity in mice via promoting IGF1 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jun 28;113(26):7219-24.

Citraro R, Scicchitano F, De Fazio S, Raggio R, Mainardi P, Perucca E, De Sarro G, Russo E. Preclinical activity profile of  $\alpha$ -lactalbumin, a whey protein rich in tryptophan, in rodent models of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res*. 2011 Jun; 95(1-2):60-9.

Closa-Monasterolo R1, Ferré N, Luque V, Zaragoza-Jordana M, Grote V, Weber M, Koletzko B, Socha P, Gruszfeld D, Janas R, Xhonneux A, Dain E, Scaglioni S, Escribano J; Childhood Obesity Project Study Group. Sex differences in the endocrine system in response to protein intake early in life. *Am J Clin Nutr*. 2011 Dec;94(6 Suppl):1920S-1927S.

- Comerford KB, Pasin G. Emerging Evidence for the Importance of Dietary Protein Source on Glucoregulatory Markers and Type 2 Diabetes: Different Effects of Dairy, Meat, Fish, Egg, and Plant Protein Foods. *Nutrients*. 2016 Jul 23;8(8).
- Conceição EP, Trevenzoli IH, Oliveira E, Franco JG, Carlos AS, Nascimento-Saba CC, Moura EG, Lisboa PC. Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. *Horm Metab Res*. 2011 Jun;43(7):513-6.
- Contreras, MdM; Carrón, R; Montero,MJ; Ramos, M; Recio, I. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*. 2009 Oct; 19(10) 566–573.
- Courties A, Sellam J, Berenbaum F. Metabolic syndrome-associated osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2017 Mar;29(2):214-222.
- Crepaldi SC, Carneiro EM, Boschero AC. Long-term effect of prolactin treatment on glucose-induced insulin secretion in cultured neonatal rat islets. *Horm Metab Res*. 1997 May;29(5):220-4.
- Cunningham J, Locatelli F, Rodriguez M. Secondary hyperparathyroidism: pathogenesis, disease progression, and therapeutic options. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Apr; 6(4):913-21.
- Dang S, Yan H, Yamamoto S, Wang X, Zeng L. Feeding practice among younger Tibetan children living at high altitudes. *Eur J Clin Nutr*. 2005 Sep;59(9):1022-9.
- Daniel, H; Vohwinkel; Rehner, G, J, N. Effect of casein and  $\beta$ -casomorphins on gastrointestinal mobility in rats. *J, Nutr*, 1990, 120, 252–257.
- De Albuquerque Maia L, Lisboa PC, de Oliveira E, da Silva Lima N, Lima IC, Lopes RT, Ruffoni LD, Nonaka KO, de Moura EG. Bone metabolism in obese rats programmed by early weaning. *Metabolism*. 2014 Mar;63(3):352-64.
- De Moura EG, Bonomo IT, Nogueira-Neto JF, de Oliveira E, Trevenzoli IH, Reis AM, Passos MC, Lisboa PC. Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny, *J Physiol*, 2009;587:4919–29.
- De Moura EG, Bonomo IT, Nogueira-Neto JF, de Oliveira E, Trevenzoli IH, Reis AM, Passos MC, Lisboa PC. Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. *J Physiol*. 2009 Oct 15;587(Pt 20):4919-29.
- De Moura EG, Lisboa PC, Passos MCF. Neonatal programming of neuroimmunomodulation-role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation*. 15(3):176-88, 2008.
- De Moura EG, Bonomo IT, Nogueira-Neto JF, de Oliveira E, Trevenzoli IH, Reis AM, Passos MC, Lisboa PC. Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. *J Physiol*. 2009 Oct 15;587(Pt 20):4919-29.
- Dewey KG, CohenRJ, Rivera LL, et al. Effects of age at introduction of complementary foods to breast fed infants on duration of lactation amenorrhea in Honduran women. *Am J Clin Nutr*. V. 65, p. 1403-1409, 1997.

El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 2000 Jun;105(12):1827-32.

Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling, *J Biol Chem*, 2000 May 26; 275(21):15985-91.

Eny EM, Nascimento MJP. Causas e conseqüências do desmame precoce: uma abordagem histórico-cultural, *Rev Enferm UNISA*, 2001; v,2; p,52-6.

Erb R, Sitarz N, Malven P. Blood plasma and Milk prolactin, and effects of 15 sampling technique on composition of Milk from suckled ewes. *J DairySci* 1977; 16 60:157-203.

Ernst MB, Wunderlich CM, Hess S, Paehler M, Mesaros A, Koralov SB, Kleinriders A, Husch A, Münzberg H, Hampel B, Alber J, Kloppenburg P, Brüning JC, Wunderlich FT. Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *J Neurosci.* 2009 Sep 16;29(37):11582-93.

Espíndola-antunes, D e Kater, C. Adipose Tissue Expression of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Cushing's Syndrome and in Obesity, *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007;51/8.

Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Santos-Silva AP, de Oliveira E, Trevenzoli IH, Casimiro-Lopes G, Nogueira-Neto JF, Lisboa PC. Temporal evaluation of body composition, glucose homeostasis and lipid profile of male rats programmed by maternal protein restriction during lactation. *Horm Metab Res.* 2009 Dec;41(12):866-73.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. Milk and dairy products in human nutrition. Roma 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>>. Acesso em: 12 jan 2017.

Farmer SR. Regulation of PPAR $\gamma$  activity during adipogenesis. *Int J Obes (Lond).* 2005 Mar;29 Suppl 1:S13-6.

Feng Y, Famuyide M, Bhatt AJ. Dexamethasone decreases insulin-like growth factor-I and -II via a glucocorticoid receptor dependent mechanism in developing rat brain. *Neuro Endocrinol Lett.* 2013;34(7):624-34.

Fichna J; Janecka A; Costentin J; Do Rego JC. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol Rev*, 2007 Mar; 59(1):88-123.

Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium, Magnesium, 13 Phosphorus, Vitamin D, and Fluoride. Washington DC: National Academy Press, 14 Institute of Medicine, 1997:250– 87.

Freitas MC, Ceschini FL, Ramallo BT. Resistência à insulina associada à obesidade: Efeitos anti-inflamatórios do exercício físico. *R. Bras. Ci. e Mov.* 2014; 22(3): 139-147.

FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA (Unicef), The International Code of Marketing of Breast-milk Substitutes, Genebra, 1981. Disponível em: <[http://www.who.int/nutrition/publications/code\\_english.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/code_english.pdf)>. Acesso em: 12 jan 2017.

García-Escobar E, Rodríguez-Pacheco F, Haro-Mora JJ, Gomez-Zumaquero JM, Rubio-Martín E, Gutierrez-Repiso C, Soriguer F, Rojo-Martínez G. Effect of insulin analogues on 3t3-l1 adipogenesis and lipolysis. *Eur J Clin Invest*. 2011 Sep;41(9):979-86.

Giust V, Verdumo C, Suter M, Gaillard RC, Burckhardt P, Pralong F: Expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 1 and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2 in visceral and adipose tissue of obese women. *Diabetes* 52:1673-1676, 2003.

Gluckman PD, Hanson MA. Developmental plasticity and human disease: research directions. *J Intern Med*. 2007 May;261(5):461-71.

Golden PL, Maccagnan TJ, Pardridge WM. Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J Clin Invest*. 1997 Jan 1;99(1):14-8.

Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Jan;13(1):36-49.

Guesdon B, Messaoudi M, Lefranc-Millot C, Fromentin G, Tomé D, Even PC. A tryptic hydrolysate from bovine milk alphaS1-casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress. *Peptides*. 2006 Jun;27(6):1476-82.

Günther AL, Remer T, Kroke A, Buyken AE. Early protein intake and later obesity risk: which protein sources at which time points throughout infancy and childhood are important for body mass index and body fat percent age at 7 y of age? *Am J Clin Nutr*. 2007 Dec;86(6):1765-72.

Harder T, Bergmann R, Kallischnigg G, et al. Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2005; 162:397–403.

Harit D, Faridi MM, Aggarwal A, Sharma SB. Lipid profile of term infants on exclusive breastfeeding and mixed feeding: a comparative study. *Eur J Clin Nutr*. 2008 Feb;62(2):203-9.

Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64(4):832–835.

Hayes M; Stanton C; Fitzgerald GF; Ross RP. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides, Part II: Bioactive peptide functions, *Biotechnol, J*, 2007, 2, 435–449

Health Canada. Nutrition for Healthy Term Infants: Recommendations from Birth to Six Months. Disponível em:<<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/infant-nourisson/recom/index-eng.php#a11,3>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

Heaney RP, McCarron DA, Dawson-Hughes B, Oparil S, Berga SL, Stern JS, Barr SI, Rosen CJ. Dietary changes favorably affect bone remodeling in older adults. *J Am Diet Assoc*. 1999 Oct;99(10):1228-33.



Hill DR e Newburg DS. Clinical applications of bioactive milk components. *Nutr Rev.* 2015 Jul;73(7):463-76.

Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney R, Murad MH, Weaver CM. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:1911–1930.

Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007 Jul 19; 357(3):266-81.

Hoppe C, Molgaard C, Vaag A, Barkholt V, Michaelsen KF. High intakes of milk, but not meat, increase s-insulin and insulin resistance in 8-year-old boys. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:393–8.

Hoppe C, Udam TR, Lauritzen L, Molgaard C, Juul A, Michaelsen KF. Animal protein intake, serum insulin-like growth factor I, and growth in healthy 2.5-y-old Danish children. *Am J Clin Nutr* 2004;80:447–52.

Hoppe C, Molgaard C, Dalum C, Vaag A, Michaelsen KF. Differential effects of casein versus whey on fasting plasma levels of insulin, IGF-1 and IGF-1/IGFBP-3: results from a randomized 7-day supplementation study in prepubertal boys. *Eur J Clin Nutr.* 2009 Sep;63(9):1076-83.

Hörnell A, Lagström H, Lande B, Thorsdottir I. Breastfeeding, introduction of other foods and effects on health: a systematic literature review for the 5th Nordic Nutrition Recommendations. *Food Nutr Res.* 2013 Apr 12;57.

Hörnell A, Lagström H, Lande B, Thorsdottir I. Protein intake from 0 to 18 years of age and its relation to health: a systematic literature review for the 5th Nordic Nutrition Recommendations. *Food Nutr Res.* 2013 May 23;57.

Horwood LJ, Darlow BA, Mogridge N. Breast Milk feeding and cognitive ability at 7-8 years. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 2001; v,84; p,23-f27.

Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes.* 2007 Apr;56(4):901-11.

Hughes KA, Manolopoulos KN, Iqbal J, et al. Recycling between cortisol and cortisone in human splanchnic, subcutaneous adipose, and skeletal muscle tissues in vivo. *Diabetes.* 2012; 61, 1357– 726 64.

Ibars M, Ardid-Ruiz A, Suárez M, Muguerza B, Bladé C, Aragonès G. Proanthocyanidins potentiate hypothalamic leptin/STAT3 signalling and Pomc gene expression in rats with diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond).* 2017 Jan;41(1):129-136.

Incollingo RAC, Epel ES, White ML, Standen EC, Seckl JR, Tomiyama AJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;62:301–318.

Jakobsson LTH, Jakobsson ME, Askling J, Knowler WC. Perinatal characteristic and risks of rheumatoid arthritis. *BMJ*. V. 48, p. 1068-1069, 2003 .

Jenness R. Lactational performance of various mammalian species. *J Dairy Sci*. 1986 Mar;69(3):869-85.

Jiehui Z; Liuliu M; Haihong X; Yang G; Yingkai J; Lun Z, Li DX; Dongsheng Z; Shaohui Z; Immunomodulating effects of casein-derived peptides QEPVL and QEPV on lymphocytes in vitro and in vivo. *Food Funct*, 2014 Sep;5(9):2061-9.

Johnson DW, Barnes MA, Akers RM, Pearson RE. A synthetic opioid peptide increases plasma growth hormone and prolactin in Holstein calves. *J Anim Sci*. 1993 Apr;71(4):1004-9.

Junqueira JM, Navarro AM, Cintra RMGC, Dias LCGD. Padrão alimentar de crianças brasileiras menores de 2 anos: uma visão crítica. *Rev Simbio-logias* 2008; 1(1):184-199.

Juruena, MF; Cleare, AJ; Pariante,CM. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão, *Rev, Bras, Psiquiatr*, vol,26 no,3 São Paulo Sept, 2004.

Kane L, Ismail N. Puberty as a vulnerable period to the effects of immune challenges: Focus on sex differences. *Behav Brain Res*. 2017 Mar 1;320:374-382.

Kanwar JR; Kanwar RK; Sun X; Punj V; Matta H; Morley SM; Parratt A; Puri M; Sehgal R. Molecular and Biotechnological Advances in Milk Proteins in Relation to Human Health. *Current Protein and Peptide Science*, 2009, Vol, 10, No, 4.

Karaki H, Doi K, Sugano S, Uchiwa H, Sugai R, Murakami U, Takemoto S. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats *Comp Biochem Physiol C*. 1990;96(2):367-71.

Kato Y, Iwasaki Y, Abe H, Ohgo S, Imura H. Effects of endorphins on prolactin and growth hormone secretion in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1978 Jul; 158(3):431-6

Katz N, Mazer NA. The impact of opioids on the endocrine system. *Clin J Pain*. 2009 Feb;25(2):170-5.

Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev*. 2007 Jan;8(1):21-34.

Koletzko B, von Kries R, Closa R, Escribano J, Scaglioni S, Giovannini M, Beyer J, Demmelmair H, Gruszfeld D, Dobrzanska A, Sengier A, Langhendries JP, Rolland Cachera MF, Grote V. Lower protein in infant formula is associated with lower weight up to age 2 y: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr*. 2009 Jun; 89(6):1836-45.

Kuryszko J, Sławuta P, Sapikowski G. Secretory function of adipose tissue. *Pol J Vet Sci*. 2016;19(2):441-6

Labbok, MH. Effects of breastfeeding on the mother. *Pediatr Clin North Am.* V.48, p. 143-58, 2001.

Lara-Villoslada F, Olivares M, Xaus J. The Balance Between Caseins and Whey Proteins in Cow's Milk Determines its Allergenicity. *J, DairySci*, Vol, 88, No, 5, 1654–1660, 2005.

Lazaretti-Castro, M e Bianco, AC. Fisiologia do metabolismo osteomineral. In Aires MM. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. P 1199-1223.

Lee JH, Gao Z, Ye J. Regulation of 11 $\beta$ -HSD1 expression during adipose tissue expansion by hypoxia through different activities of NF- $\kappa$ B and HIF-1 $\alpha$ . *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 May 15;304(10):E1035-41.

Leshner AI, Litwin VA, Squibb RL. A simple method for carcass analysis. *Physiol Behav* 1972, 9(2):281-2.

Lima Nda S, de Moura EG, Passos MC, Nogueira Neto FJ, Reis AM, de Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. *Br J Nutr.* 2011. V. 105; n. 9; p.1405-1413. doi: 10.1017/S0007114510005064.

Lima NS, Moura EG, Franco JG, Pinheiro CR, Pazos-Moura CC, Cabanelas A, Carlos AS, Nascimento-Saba CC, de Oliveira E, Lisboa PC. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res.* 2013 Jan;45(1):22-30.

Liu S, Mauvais-Jarvis F. Minireview: Estrogenic protection of beta-cell failure in metabolic diseases. *Endocrinology.* 2010 Mar;151(3):859-64.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time 20 quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods.* 2001; 25:402-408.  
Lo KA, Labadorf A, Kennedy NJ, Han MS, Yap YS, Matthews B, Xin X, Sun L, Davis RJ, Lodish HF, Fraenkel E. Analysis of in vitro insulin-resistance models and their physiological relevance to in vivo diet-induced adipose insulin resistance. *Cell Rep*, 2013 Oct 17;5(1):259-70.

Löfberg E, Gutierrez A, Wernerman J, Anderstam B, Mitch WE, Price SR, Bergström J, Alvestrand A. Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. *Eur J Clin Invest.* 2002 May;32(5):345-53.

López-Alarcón M, Garza C, Habicht JP, Martínez L, Pegueros V, Villalpando S. Breastfeeding attenuates reductions in energy intake induced by a mild immunologic stimulus represented by DPTH immunization: possible roles of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha and leptin. *J Nutr.* 2002 Jun;132(6):1293-8.

Lordelo RA1, Mancini MC, Cercato C, Halpern A. Hormonal axes in obesity: cause or effect? *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Feb;51(1):34-41.

Lowry OH, Roseberough NJ, Sarral, Randal, RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

Lozano JM, Forcada F, Abecia JA. Opioidergic and nutritional involvement in the control of luteinizing hormone secretion of postpartum Rasa Aragonesa ewes lambing in the mid-breeding season. *Anim Reprod Sci* 1998; 52: 267.

Majumde, K; Wu J. Molecular targets of antihypertensive peptides: understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. *Int J Mol Sci*, 2014 Dec 24;16(1):256-83.

Malbrain ML, De Laet I, De Waele JJ, Sugrue M, Schachtrupp A, Duchesne J, Van Ramshorst G, De Keulenaer B, Kirkpatrick AW, Ahmadi-Noorbakhsh S, Mulier J, Pelosi P, Ivatury R, Pracca F, David M, Roberts DJ. The role of abdominal compliance, the neglected parameter in critically ill patients - a consensus review of 16. Part 2: measurement techniques and management recommendations. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2014 Nov-Dec;46(5):406-32.

Márcia Maria Tavares Machado. A conquista da amamentação: o olhar da mulher, fortalece-  
ceará / 1999, Universidade Federal do Ceará, Dissertação. Disponível em:  
<[http://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/15799/1/1999\\_dis\\_mmtmachado.pdf](http://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/15799/1/1999_dis_mmtmachado.pdf)>. Acesso em 28 dez. 2016.

Mårild S, Hansson S, Jodal U, Odén A, Svedberg K. Protective effect of breastfeeding against urinary tract infection. *Acta Paediatr*. 2004. Feb;93(2):164-8.

Mariniello B, Ronconi V, Rilli S, Bernante P, Boscaro M, Mantero F, Giacchetti G. Adipose tissue 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in obesity and Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2006 Sep;155(3):435-41.

Markey CN, August KJ, Bailey LC, Markey PM, Nave CS. The pivotal role of psychology in a comprehensive theory of obesity. *Health Psychol Open*. 2016 Mar 27;3(1):2055102916634365.

Martinelli CE Jr1, Custódio RJ, Aguiar-Oliveira MH. Physiology of the GH-IGF axis. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Jul;52(5):717-25.

Masuzaki H, Paterson JM, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR: A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294:2166-2170, 2001.

Medhammar E, Wijesinha-Bettoni R, Stadlmayr B, Nilsson E, Charrondiere UR, Burlingame B. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *J Sci Food Agric*, 2012 Feb;92(3):445-74.

Meisel H, Biochemical Properties of Peptides Encrypted in Bovine Milk Proteins, *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12, 1905-1919 1905.

Meisel H, FitzGerald RJ. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *Br J Nutr*. 2000 Nov;84 Suppl 1:S27-31.

Meisel, H. Press Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors*. 21 (2004) 55–61 55 IOS.

Meisel, H. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications, *Livestock Prod, Sci*, 1997, 50, 125–138.

Michaelsen KF. Are there negative effects of an excessive protein intake? *Pediatrics* 2000; 106: 1293.

Migliore-Samour D; Floc'h F; Jollès P. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J Dairy Res*. 1989;56(3):357-62.

Miguel M, Gómez-Ruiz JÁ, Recio I, Aleixandre A. Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Mol Nutr Food Res*. 2010 Oct;54(10):1422-7.

Monte CMG e Giugliani ERJ. Recomendações para alimentação complementar da criança em aleitamento materno, *J Pediatr (Rio J)*, 2004;80(5 Supl):S131-41. Acesso em: 29/12/2016 Disponível em: <http://www.jpmed.com.br/conteudo/04-80-S131/port,asp>

Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, Torisu T, Chien KR, Yasukawa H, Yoshimura A. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat Med*. 2004 Jul;10(7):739-43.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*. 2016 Apr 2;387(10026):1377-96.

Newell-Fugate AE. The role of sex steroids in white adipose tissue adipocyte function. *Reproduction*. 2017 Jan 23. pii: REP-16-0417.

Nobre JL, Lisboa PC, Peixoto-Silva N, Quitete FT, Carvalho JC, de Moura EG, de Oliveira E. Role of vitamin D in adipose tissue in obese rats programmed by early weaning and post diet calcium. *Mol Nutr Food Res*. 2016 Apr;60(4):810-22.

Nobre JL, Lisboa PC, Lima Nda S, Franco JG, Nogueira Neto JF, de Moura EG, de Oliveira E. Calcium supplementation prevents obesity, hyperleptinaemia and hyperglycaemia in adult rats programmed by early weaning. *Br J Nutr*. 2012 Apr;107(7):979-88.

Norooznehad AH, Norooznehad F. Cannabinoids: Possible agents for treatment of psoriasis via suppression of angiogenesis and inflammation. *Med Hypotheses*. 2017 Feb;99:15-18.

Nuttall FQ, Mooradian AD, Gannon MC, Billington C, Krezowski P. Effect of protein ingestion on the glucose and insulin response to a standardized oral glucose load. *Diabetes Care*. 1984 Sep-Oct;7(5):465-70.

Obici S, Feng Z, Karkanas G, Baskin DG, Rossetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci*. 2002 Jun;5(6):566-72.

Oddy WH, Smith GJ, Jacoby P. A possible strategy for developing a model to account for attrition bias in a longitudinal cohort to investigate associations between exclusive breastfeeding and overweight and obesity at 20 years. *Ann NutrMetab* 2014; 65(2-3):234-5.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. Infant and young child feeding : model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals, Geneva, 2009b. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44117/1/9789241597494\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44117/1/9789241597494_eng.pdf)>. Acesso em: 15 dez 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. Razões médicas aceitáveis para uso de substitutos do leite materno, ATUALIZAÇÃO – OMS, 2009. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69938/2/WHO\\_FCH\\_CAH\\_09\\_01\\_por.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69938/2/WHO_FCH_CAH_09_01_por.pdf)> .Acesso em: 15 dez 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – The optimal duration of exclusive breastfeeding – Report of an Expert Consultation – Geneva, Switzerland, March 2001. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67219/1/WHO\\_NHD\\_01.09.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67219/1/WHO_NHD_01.09.pdf?ua=1)>. Acesso em: 15 dez 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE OMS. The world health report 2000. Obesity – preventing and managing the global epidemic II series. 2000. Geneve. Disponível em: <[www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO\\_TRS.../en/](http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS.../en/)>. Acesso em: 15 dez 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Indicators for assessing infant and young child feeding practices : conclusions of a consensus meeting held 6–8 November 2007 in Washington D.C., USA. Disponível em: <[https://www.unicef.org/nutrition/files/IYCF\\_updated\\_indicators\\_2008\\_part\\_1\\_definitions.pdf](https://www.unicef.org/nutrition/files/IYCF_updated_indicators_2008_part_1_definitions.pdf)>. Acesso em: 28 dez 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Library Cataloguing-in-Publication Data Indicators for assessing infant and young child feeding practices part 3: country profiles 2010. Disponível em: <[https://www.unicef.org/nutrition/files/IYCF\\_Indicators\\_part\\_III\\_country\\_profiles.pdf](https://www.unicef.org/nutrition/files/IYCF_Indicators_part_III_country_profiles.pdf)>. Acesso em: 28 dez 2016

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Comprehensive implementation plan on maternal, infant and young child nutrition, WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland, 2014. Disponível em: <[apps.who.int/iris/bitstream/.../WHO\\_NMH\\_NHD\\_14.1\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/.../WHO_NMH_NHD_14.1_eng.pdf)> Acesso em: 28 dez 2016.

Panchenko PE, Lemaire M, Fneich S, Voisin S, Jouin M, Junien C, Gabory A. Epigenetics and Nutrition: maternal nutrition impacts on placental development and health of offspring. *Biol Aujourdhui*. 2015;209(2):175-87.

Parker F, Migliore-Samour D, Floch F, Zerial A, Werner GH, Jolles J, Casaretto M, Zahn H & Jolles P (1984) Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis, and biological properties. *European Journal of Biochemistry* 145, 677.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed. San Diego: 17 Academic Press; 1998.

Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*. 2011 Nov;60(11):1500-10.

Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P, von Fellenberg R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule, *Biochim Biophys Acta* 1999;1426:439–48.

Pérez-Cano FJ, Marín-Gallén S, Castell M, Rodríguez-Palmero M, Rivero M, Franch A, Castellote C. Bovine whey protein concentrate supplementation modulates maturation of immune system in suckling rats. *Br J Nutr* 2007; Suppl. 1, S80–S8.

Peterson GL. A simplification of the protein assay method of lowry et al. Which is 19 more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83:346-56.

Petridou E, Mantzoros CS, Belechri M, Skalkidou A, Dessypris N, Papatoma E, Salvanos H, Lee JH, Kedikoglou S, Chrousos G, Trichopoulos D. Neonatal leptin levels are strongly associated with female gender, birth length, IGF-I levels and formula feeding. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 Mar;62(3):366-71.

Pi-sunyer, F. X. Health implications of obesity. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.53, suppl. 6, p.1595-1603, jun. 1991.

Portha B, Fournier A, Kioon MD, Mezger V, Movassat J. Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility. *Biochimie*. 2014 Feb;97:1-15.

Raff H, Findling JW. A Physiologic approach to diagnosis of the cushing syndrome, *Ann Intern Med* 2003; 138:980-91.

Ravelli, G.P.; Stein, Z.A; Susser, M.W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*,v. 295, n. 7, p. 349-353, 1976.

Rea MF. Substitutos do leite materno: passado e presente, *Rev, Saúde Pública*, vol,24; no,3;p241-249; São Paulo June 1990.

Reynolds A. Breastfeeding and brain development. *Pediatr Clin North Am*, 2001; v,48; p,159-171.

Reynolds JA, Bruce IN. Vitamin D treatment for connective tissue diseases: hope beyond the hype? *Rheumatology (Oxford)*. 2017 Feb;56(2):178-186.

Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Dutra SC, Lisboa PC. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *J Physiol*. 2009 Jun 1;587(Pt 11):2647-61.

Rolland-Cachera MF, Deheeger M, Akrouit M, Bellisle F. Influence of macronutrients on adiposity development: a follow up study of nutrition and growth from 10 months to 8 years of age. *Int J Obes Rel Metabol Dis* 1995; 19: 573\_8.

Rollins NC, Bhandari N, Hajeebhoy N, Horton S, Lutter CK, Martines JC, Piwoz EG, Richter LM, Victora CG; Lancet Breastfeeding Series Group, Why invest, and what it will take to improve breastfeeding practices? *Lancet*, 2016 Jan 30;387(10017):491-504.

Sakaguchi M, Koseki M, Wakamatsu M, Matsumura E, Effects of beta-casomorphin-5 on passive avoidance response in mice, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003 Nov; 67(11):2501-4.

Santos-Silva AP1, Moura EG, Pinheiro CR, Rios AS, Abreu-Villaça Y, Passos MC, Oliveira E, Lisboa PC. Neonatal nicotine exposure alters leptin signaling in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in the late postnatal period and adulthood in rats. *Life Sci*. 2010 Jul 31;87(5-6):187-95.

SBAM. Sociedade Brasileira de Alimentação e nutrição – SBAM. A importância do consumo de leite no atual cenário nutricional brasileiro. Disponível em: <[http://sban.cloudpanel.com.br/source/SBAN\\_Importancia-do-consumo-de-leite.pdf](http://sban.cloudpanel.com.br/source/SBAN_Importancia-do-consumo-de-leite.pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2016.

Scavo LM, Karas M, Murray M, Leroith D, Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes, *J Clin Endocrinol Metab*, 2004 Jul;89(7):3543-53.

Schusdziarra V, Holland A, Schick R, de la Fuente A, Klier M, Maier V, et al. Modulation of post-prandial insulin release by ingested opiate-like substances in dogs. *Diabetologia* 1983; 24: 113.

Sefton C, Harno E, Davies A, Small H, Allen TJ, Wray JR, Lawrence CB, Coll AP, White A. Elevated Hypothalamic Glucocorticoid Levels Are Associated With Obesity and Hyperphagia in Male Mice. *Endocrinology*. 2016 Nov;157(11):4257-4265.

Sgarbieri, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e FísicoQuímicas das Proteínas do Leite Braz. *J. Food Technol.*, v.8, n.1, p. 43-56, jan./mar., 2005.

Shah NP. Effects of milk-derived bioactives: an overview, *Br J Nutr*, 2000 Nov; 84 Suppl 1:S3-10.

Sipola M, Finckenberg P, Korpela R, Vapaatalo H, Nurminen ML. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J Dairy Res*. 2002 Feb;69(1):103-11.

Sipola, M; Finckenberg, P; Vapaatalo, H; Pihlanto-Leppala, A, et al. Alpha-lactophin and beta-lactophin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*, 2002, 71, 1245–1253.

Small GR, Hadoke PW, Sharif I, Dover AR, Armour D, Kenyon CJ, Gray GA, Walker BR. Preventing local regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enhances angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 23;102(34):12165-70.



Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C, Rubin CS, Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes, *J Biol Chem*, 1988 Jul 5;263(19):9402-8.

Soares MJ, Murhadi LL, Kurpad AV, Chan She Ping-Delfos WL, Piers LS. Mechanistic roles for calcium and vitamin D in the regulation of body weight. *Obes Rev*. 2012 Jul; 13(7):592-605.

Sorenson RL1, Brelje TC. Prolactin receptors are critical to the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology*. 2009 Apr;150(4):1566-9.

Spadoti LM. e Moreno I. Peptídeos bioativos de produtos lácteos, *Funcionais & nutracêuticos*. Ed Insumo. Nº1 (Março), p 26 -38.

Stanner SA1, Bulmer K, Andrès C, Lantseva OE, Borodina V, Poteen VV, Yudkin JS. Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *BMJ*. 1997 Nov 22;315(7119):1342-8.

Stewart PM, Tomlinson JW, Cortisol, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and central obesity, *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:94-5.

Stewart PM. Tissue-specific Cushing's syndrome, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and the redefinition of corticosteroid hormone action, *Eur J Endocrinol* 2003;149:163-8.

Stimson RH, Walker BR. The role and regulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2013 Sep;15(2):37-48.

Stimson RH, Walker BR. The role and regulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2013 Sep;15(2):37-48.

Sun Z, Zhang Z, Wang X, Cade R, Elmir Z, Fregly M. Peptides. Relation of beta-casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. 2003 Jun;24(6):937-43.

Sung CC, Liao MT, Lu KC, Wu CC. Role of vitamin D in insulin resistance. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:634195.

Symonds ME, Sebert SP, Hyatt MA, Budge H. Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 Nov;5(11):604-10.

Szklarczyk K, Korostynski M, Golda S, Piechota M, Ficek J, Przewlocki R. Endogenous opioids regulate glucocorticoid-dependent stress-coping strategies in mice. *Neuroscience*. 2016 Aug 25;330:121-37.

Teschemacher H, Umbach U, Hamel U, Praetorius G, Ahnerthilger G, Brantl V, et al, No evidence for the presence of beta-casomorphins in human plasma after injections of cows' milk or milk products, *J Dairy Res* 1986;53(1):135-8.

Teschemacher H. Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Curr Pharm Des.* 2003;9(16):1331-44.

Thon M, Hosoi T, Ozawa K. Possible Integrative Actions of Leptin and Insulin Signaling in the Hypothalamus Targeting Energy Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016 Oct 20;7:138.

Tiano JP, Mauvais-Jarvis F. Importance of oestrogen receptors to preserve functional beta-cell mass in diabetes. *Nat Rev Endocrinol.* 2012, 8: 342–351.

Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin, *J Dairy Sci* 1991;74:4137–42.

Trinchese G, Cavaliere G, Canani RB, Matamoros S, Bergamo P, De Filippo C, Aceto S, Gaita M, Cerino P, Negri R, Greco L, Cani PD, Mollica MP. Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by modulating mitochondrial function and gut microbiota. *J Nutr Biochem.* 2015 Nov;26(11):1136-46.

Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002;53(4):865-71.

Turck D. Cow's milk and goat's milk, *World Rev Nutr Diet*, 2013;108:56-62, Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24029787>>. Acesso em: 29 dez. 2016

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. The surgeon general's call to action to prevent and decrease overweight and obesity. [Rockville, MD]: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General, 2001.

Unger RH. The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:333-47.

UNICEF Brasil, Aleitamento Materno. Disponível em: <[https://www.unicef.org/brazil/pt/activities\\_10003.htm](https://www.unicef.org/brazil/pt/activities_10003.htm)>. Acesso em: 28 dez. 2016.

UNICEF, Infant and young child feeding, Nutrition section, Programmes, Unicef New York, May 2011. Disponível em: <[https://www.unicef.org/nutrition/files/Final\\_IYCF\\_programming\\_guide\\_2011.pdf](https://www.unicef.org/nutrition/files/Final_IYCF_programming_guide_2011.pdf)>. Acesso em: 28 dez. 2016.

Victora CG, Bahl R, Barros AJ, França GV, Horton S, Krasevec J, Murch S, Sankar MJ, Walker N, Rollins NC, Lancet Breastfeeding Series Group, Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect, *Lancet*, 2016 Jan 30;387(10017):475-90.

Victora CG, Smith PG, Vaughan JP, Nobre LC, Lombardi C, Teixeira AM, et al. Evidence for protection by breastfeeding against infant deaths from infectious diseases in Brazil. *Lancet* 1987; 2(8554):319–21.

- Vimaleswaran KS, Berry DJ, Lu C, Tikkanen E, Pilz S, Hiraki LT, Cooper JD, Dastani Z, Li R, Houston DK, Wood AR, Michaëlsson K, Vandenput L, Zgaga L, Yerges-Armstrong LM, McCarthy MI, et al. Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS Med.* 2013;10(2):e1001383.
- Vinagre RD, Diniz EMA, Vaz FAC. Leite humano: um pouco de sua história, *Pediatria (São Paulo)*, 2001; 23(4):340-5.
- Vitolo, M,R. *Nutrição: da gestação ao envelhecimento* – Rio de Janeiro, Ed: Rubio, 2008.
- Wada Y, Phinney BS, Weber D, Lönnerdal B. In vivo digestomics of milk proteins in human milk and infant formula using a suckling rat pup model. *Peptides.* 2017 Feb;88:18-31.
- Wada Y, Lönnerdal B. Bioactive peptides derived from human milk proteins--mechanisms of action. *J Nutr Biochem.* 2014 May;25(5):503-14.
- Wade, GN, and JM Gray 1979 Gonadal effects on food intake and adiposity: A metabolic hypothesis. *Physiology & Behavior* 22 583-593.
- Weinstein RS, Wan C, Liu Q, Wang Y, Almeida M, O'Brien CA, Thostenson J, Roberson PK, Boskey AL, Clemens TL, Manolagas SC. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. *Aging Cell.* 2010 Apr;9(2):147-61.
- World Obesity Federation. New figures indicate 2.7 billion adults worldwide will be overweight by 2025. Oct-2015. Disponível em: <[http://www.worldobesity.org/site\\_media/uploads/World\\_Obesity\\_Day\\_Press\\_Release.pdf](http://www.worldobesity.org/site_media/uploads/World_Obesity_Day_Press_Release.pdf)>. Acesso em: 14 jan. 2017.
- Wu Y, Lucia K, Lange M, Kuhlen D, Stalla GK, Renner U. Hypoxia inducible factor-1 is involved in growth factor, glucocorticoid and hypoxia mediated regulation of vascular endothelial growth factor-A in human meningiomas. *J Neurooncol.* 2014 Sep;119(2):263-73.
- Yamada A, Sakurai T, Ochi D, Mitsuyama E, Yamauchi K, Abe F. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein. *Food Chem.* 2013 Dec 15;141(4):3781-9.
- Yilmaz B, Gilmore DP. Opioid modulation of hypothalamic catecholaminergic neurotransmission and the pre-ovulatory LH surge in the rat. *Neuro Endocrinol Lett.* 1999;20(1-2):115-121.
- Zsakai, A, Z Karkus, K Utczas, B Biri, LL Sievert, and EB Bodzsar 2016 Body fatness and endogenous sex hormones in the menopausal transition. *Maturitas* 87 18-26.