



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

Dayse Nascimento Bernardino

**Mecanismos centrais de regulação da ingestão alimentar no modelo de programação pela suplementação com óleo de coco em ratos adultos**

Rio de Janeiro

2017

Dayse Nascimento Bernardino

**Mecanismos centrais de regulação da ingestão alimentar no modelo de programação pela  
suplementação com óleo de coco em ratos adultos**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Elaine de Oliveira

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Rio de Janeiro  
2017

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

B523 Bernardino, Dayse Nascimento.

Mecanismos centrais de regulação da ingestão alimentar no modelo de programação pela suplementação com óleo de coco em ratos adultos/ Dayse Nascimento Bernardino. – 2017.

73 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Elaine de Oliveira

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Óleo de coco - Teses. 2. Obesidade – Teses. 3. Comportamento alimentar – Teses. 4. Leptina – Teses. 5. Suplementos nutricionais. 7. Endocanabinides. I. Oliveira, Elaine de. II. Silva, Patrícia Cristina Lisboa da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU613.268

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

Dayse Nascimento Bernardino

**Mecanismos centrais de regulação da ingestão alimentar no modelo de programação pela  
suplementação com óleo de coco em ratos adultos**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 13 de julho de 2017

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine de Oliveira (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane

Instituto de Nutrição – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karen de Jesus Oliveira

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2017

## **DEDICATÓRIA**

A todos os mestres que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter até aqui me guiado e sustentado mesmo quando eu duvidava do Seu poder.

Aos professores que conduzem o Laboratório de Fisiologia Endócrina, Egberto Gaspar de Moura, Patrícia Cristina Lisboa e Elaine de Oliveira, pela oportunidade de fazer parte da equipe.

À professora Patrícia Cristina Lisboa, por sempre acreditar que eu era capaz e sempre me desafiar.

À professora Elaine de Oliveira pela incansável orientação e correção deste trabalho.

À professora Isis Hara Trevenzoli e suas alunas pós-graduandas e ICs, por sempre me receberem de portas abertas e compartilharem comigo um pouco das suas experiências com o SEC. À Isis agradeço também a doação de alguns dos anticorpos necessários para a realização do meu trabalho.

Às minhas colaboradoras Thamara Peixoto, Vanessa Tavares, Patrícia Soares e mais recentemente Deysla Sabino e Fabiele Caraméz...eu não teria conseguido sozinha.

À Beatriz Souza, pela amizade e pelos abraços de mãe sempre que eu precisava.

À Vivi, Ellen, Ana Paula, Natália, Cíntia e todo o grupo da época que eu era IC, por terem apresentado a pesquisa pra mim nesse mesmo laboratório.

À todas as colegas de labuta (rsrsrs) do LFE (não vou citar nomes porque SEMPRE esqueço de alguém quando faço isso), todas vocês contribuíram para minha formação...recebam meu abraço de agradecimento.

Aos ICs....o que seria de mim se não fossem vocês para me ajudar a fazer razão?

Aos meus pais, Maria e Antonio, por serem exemplos imaculáveis de trabalho, dedicação e honestidade, imprescindíveis para formação do meu caráter.

Sem todos vocês seria impossível.

## RESUMO

BERNARDINO, D. N. *Mecanismos centrais de regulação da ingestão alimentar no modelo de programação pela suplementação com óleo de coco em ratos adultos*. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Programação Metabólica é um fenômeno onde insultos ocorridos em estágios críticos do desenvolvimento (gestação e lactação) podem levar a disfunções metabólicas tardias. Alguns tipos de óleos, considerados saudáveis, tem sido comumente usados, mesmo nos períodos críticos. Recentemente, observamos que a exposição materna ao óleo de coco programa a prole para sobrepeso e hiperfagia. Estudamos os efeitos da suplementação materna com óleo de coco durante a lactação, bem como o impacto da exposição continuada a este óleo ao longo da vida, sobre o ganho de peso, adiposidade e o comportamento alimentar das proles adultas. Ao nascimento, as proles foram divididos em dois grupos: **1) Óleo de soja (OS)**; and **2) Óleo de coco (OC)**. As mães de cada grupo receberam os óleos por gavagem (500mg/kg de massa corporal) durante toda a lactação. Uma parte do grupo CO continuou recebendo óleo de coco ao longo da vida, adicionado na ração (OCR). Em PN180, ambos os grupos OC e OCR apresentaram maior massa corporal; mas somente os grupo OC apresentou hiperfagia, maior adiposidade visceral (MGV), hiperleptinemia e maior conteúdo de leptina na MGV, enquanto o grupo OCR apresentou hipofagia, menor MGV e normoleptinemia comparado ao OS. Ao oferecermos dietas palatáveis (hiperlipídica e hiperglicídica) por 30 minutos e 12 horas, todos os grupos preferiram a ração hiperlipídica. Porém, o grupo OCR teve uma preferência significativamente maior, caracterizando maior voracidade neste grupo comparada aos demais grupos. Não observamos modificação no receptor da leptina e na sua via de sinalização clássica (Jak2-Stat3) no núcleo hipotalâmico arqueado (ARC), mas os grupos OC e OCR apresentaram menor conteúdo de SOCS3. Somente o grupo OCR apresentou menor conteúdo de GLP1R no ARC, e o grupo OC apresentou maior conteúdo da enzima de síntese de endocanabinóide (DAGL $\alpha$ ) no núcleo hipotalâmico lateral, sem nenhuma alteração no receptor CB1 e na enzima de degradação (FAAH). A exposição materna ao óleo de coco programa para hiperfagia, sobrepeso e hiperleptinemia na idade adulta, sugerindo o desenvolvimento de resistência ao efeito anorexigênico da leptina. A via de sinalização clássica da leptina e o conteúdo do receptor de GLP1 no ARC foram normais no grupo OC e não explicam o fenótipo observado. A maior ingestão alimentar nestes animais pode ser explicada pela maior expressão da DAGL $\alpha$ , sugerindo maior síntese de 2-AG, um conhecido mediador orexigênico. A exposição continua ao óleo de coco preveniu a maior parte das disfunções observadas. Surpreendentemente, o grupo OCR, apesar de hipofágico, apresentou maior voracidade quando exposto a uma dieta hiperlipídica. Uma possível explicação para este achado é o menor conteúdo do receptor de GLP1 no ARC, uma vez que esse peptídeo inibe a ingestão alimentar de curto prazo.

**Palavras-chave:** Óleo de coco. Programação metabólica. Obesidade. Leptina. Sistema endocanabinoide.

## ABSTRACT

BERNARDINO, D. N. *Central mechanisms of food intake regulation in the programming model by maternal coconut oil supplementation in adult rats*. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Metabolic Programming is a phenomenon, in which insults at critical stages of development, such as gestation and lactation, can lead to future metabolic dysfunction. Some oils, considered healthy, have been commonly used, even at critical windows of development. Recently, we observed that maternal exposure to coconut oil programs offspring for overweight and hyperphagia. We studied the effects of maternal supplementation with coconut oil during lactation, as well as the impact of continued exposure of this oil in the chow throughout life, on weight gain, adiposity and feeding behavior of the adult offspring. At birth, the pups were divided into two groups: 1) **Soybean** oil (SO); and 2) **Coconut oil** (CO). The dams of each group received the oils by gavage (0.5g / kg body mass) during lactation. Half of the CO group continued to receive coconut oil in the chow throughout life (CO+C). In PN180, both CO and CO+C groups had overweight, but only CO group had hyperphagia, higher visceral fat mass (VFM), hyperleptinemia and increased leptin content in VFM, while CO+C group had hypofagia, lower VFM and normoleptinemia compared to SO group. When we offered palatable diets (hyperlipidic and hyperglycidic) for 30 minutes and 12 hours, all groups ate more the hyperlipidic diet. However, the CO+C group had a significantly increased preference, characterizing greater voracity in this group compared to the other groups. We observed no change in the leptin receptor and its classical signaling pathway (Jak2-Stat3) in the arcuate hypothalamic nucleus (ARC), but the CO and CO+C groups had lower SOCS3 content. Only the CO+C group had lower content of GLP1R in the ARC, and the OC group showed higher content of DAGL $\alpha$  (enzyme of endocannabinoid synthesis) in the lateral hypothalamic nucleus, with no alteration of CB1r and FAAH (enzyme of endocannabinoid degradation). Maternal exposure to coconut oil programmed for hyperphagia, overweight and hyperleptinemia in adulthood, suggesting the development of resistance to the anorexigenic leptin effect. The classical leptin signaling pathway and the receptor of GLP1 in the ARC were normal in the CO group and did not explain the observed phenotype. The higher food intake in these animals can be explained by the greater expression of DAGL $\alpha$ , suggesting a greater synthesis of 2-AG, a known orexigenic mediator. Continuous exposure to coconut oil prevented most of the observed dysfunctions. Surprisingly, the CO+C group, although hypophagic, presented greater voracity when exposed to a hyperlipidic diet. A possible explanation for this finding is the lower content of the GLP1 receptor in the ARC, since this peptide inhibits short-term food intake.

**Keywords:** Coconut oil. Metabolic programming. Obesity. Leptin. Endocannabinoid system.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Formação e inativação dos EC.....	33
Figura 2 –	Evolução da ingestão alimentar.....	48
Figura 3 –	Evolução da massa corporal.....	49
Figura 4 –	Massa de gordura visceral aos 180 dias de idade.....	50
Figura 5 –	Preferência alimentar aos 175 dias de idade.....	51
Figura 6 –	Concentrações plasmática e tecidual de leptina.....	52
Figura 7 –	Conteúdo de proteínas da via de sinalização da leptina no ARC.....	53
Figura 8 –	Conteúdo de GLP-1R no ARC.....	54
Figura 9 –	Conteúdo de proteínas do SEC no LH.....	55

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Delineamento experimental, destacando a intervenção nutricional realizada em cada grupo nos períodos de lactação e pós-desmame.....	40
Quadro 2 –	Ingredientes e composição de macronutrientes da ração complementada com óleo de coco.....	41
Quadro 3 -	Composição de macronutrientes das rações palatáveis.....	43
Quadro 4 -	Proteínas marcadas por western blotting e suas condições específicas de ensaio.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-araquidonoil glicerol
5-HT <sub>2c</sub>	<i>serotonin receptor 2c</i>
AEA	N-araquidoniletanolamida (Anandamida)
AG	Ácido Graxo
AgRP	Proteína relacionada ao <i>agouti</i>
AKT	Proteína quinase B
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
CART	transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
CB1-R	Receptor canabinóide tipo 1
CB2-R	Receptor canabinóide tipo 2
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DAGL	Diacilglicerol lipase sn-1-seletiva
DAGL $\alpha$	Diacilglicerol lipase alfa
DPP4	Dipeptidil peptidase 4
EC	Endocanabinóide
ERK 1/2	<i>Extracelular signal-regulated kinase 1 and 2</i>
FAAH	Ácido graxo amida hidrolase
FoxO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
GHS	<i>Growth hormone secretagogue</i>
GHS-R1a	Isoforma 1a do receptor growth hormone secretagogue.
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLP-1R	Receptor do peptídeo semelhante ao glucagon 1
GOAT	Grelina o-acil-transferase
GPx	Glutathiona peroxidase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IMC	Índice de massa corporal

IRS	Substrato do receptor de insulina
JAK2	Janus quinase 2
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hipotálamo lateral
LPL	Lipoproteína lipase
MAGL	Monoacil glicerol lipase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MC3R	Receptor de melanocortina 3
MCH	Hormônio concentrador de melanina
MGV	Massa de gordura visceral
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NAc	Núcleo accumbens
NAPE-PLD	Fosfolipase D seletiva para N-acil-fosfatidiletanolamina
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário
Ob-R	Receptor de leptina
Ob-Rb	Forma longa do receptor de leptina
OC	Óleo de coco
OCR	Óleo de coco ração
OS	Óleo de soja
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-quinase
PN	Pós-natal
POMC	Pró-opiomelanocortina
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PTP1B	<i>Phosphotyrosine phosphatase-1B</i>
PVN	Núcleo Paraventricular
SEC	Sistema endocanabinóide
SF1	Fator esteroideogênico 1
SM	Síndrome metabólica
SN	Substância nigra
SNC	Sistema nervoso central

SOCS3	Supressor da sinalização de citocinas 3
SOD	Superóxido dismutase
SREBP1	<i>Sterol regulatory element-binding proteins 1</i>
STAT3	Transdutor do sinal e ativador da transcrição-3
TAB	Tecido adiposo branco
TCM	Triglicerídeo de cadeia média
TGI	Trato gastrointestinal
VMN	Núcleo Ventromedial do hipotálamo
VTA	Área tegumentar ventral
MSH	Hormônio melanócito-estimulante

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
1.1	<b>Obesidade</b> .....	16
1.2	<b>Contribuição da programação metabólica para o aumento da obesidade</b> .....	16
1.3	<b>Intervenções na nutrição materna na lactação – destaque para o consumo de gorduras</b> .....	18
1.4	<b>Óleo de coco e sua utilização em períodos críticos do desenvolvimento</b> .....	20
1.5	<b>Mecanismos centrais de regulação da ingestão alimentar</b> .....	21
1.5.1	<u>Leptina</u> .....	22
1.5.2	<u>Ação central dos hormônios gastrointestinais</u> .....	25
1.5.3	<u>O sistema endocanabinóide (SEC)</u> .....	31
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	37
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	37
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
3.1	<b>Modelo de imprinting por suplementação materna com óleo de coco</b> .....	38
3.2	<b>Preparo da ração complementada com óleo de coco</b> .....	40
3.3	<b>Avaliação do estado nutricional</b> .....	41
3.3.1	<u>Massa corporal</u> .....	42
3.3.2	<u>Ingestão alimentar</u> .....	42
3.3.3	<u>Avaliação da massa de gordura visceral</u> .....	42
3.4	<b>Teste de preferência alimentar</b> .....	42
3.5	<b>Eutanásia</b> .....	43
3.6	<b>Determinação das concentrações de leptina plasmática e tecidual</b> .....	44
3.7	<b>Isolamento dos núcleos hipotalâmicos</b> .....	44
3.8	<b>Determinação do conteúdo de proteínas por western blotting</b> .....	44
3.9	<b>Análise estatística</b> .....	46
4	<b>RESULTADOS</b> .....	48

4.1	<b>Avaliação da evolução da ingestão alimentar e massa corporal do período do desmame até a idade adulta (180 dias).....</b>	<b>48</b>
4.2	<b>Avaliação da massa de gordura visceral aos 180 dias de idade.....</b>	<b>49</b>
4.3	<b>Preferência alimentar por dietas palatáveis na vida adulta.....</b>	<b>50</b>
4.4	<b>Concentração de leptina plasmática e tecidual.....</b>	<b>51</b>
4.5	<b>Reguladores de curto e longo prazo da ingestão alimentar: a via de sinalização da leptina, receptor de GLP-1 e o sistema endocanabinóide (SEC).....</b>	<b>52</b>
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>

## INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica de origem multifatorial caracterizada por um acúmulo excessivo de tecido adiposo, que quando ocorre na região abdominal, torna-se o principal desencadeador das desordens metabólicas típicas. Muitas estratégias têm sido empregadas a fim de evitar o desenvolvimento da obesidade, assim como para tratá-la. O consumo de alimentos funcionais é uma delas e tem se tornado muito popular, sobretudo entre as mulheres, inclusive durante os períodos de gestação e lactação. Nesse contexto, o uso de óleos não habituais, como o óleo de coco, tem ganhado destaque para substituição das fontes de gordura tradicionais da dieta. Porém, sabe-se que alterações na nutrição materna durante tais períodos podem predispor a obesidade e outras doenças na progênie na vida adulta.

Portanto, a obesidade pode ter sua etiologia na gestação, infância ou adolescência, períodos considerados críticos à exposição a insultos (ambientais, nutricionais ou hormonais) que associados as condições diferentes da janela crítica, podem ser determinantes para a condição futura de saúde. Assim, quando a condição desfavorável permanece ao longo da vida, o indivíduo torna-se melhor adaptando. No entanto, quando o insulto é transitório, aumenta-se o risco de desenvolvimento de doenças, principalmente as crônicas não-transmissíveis na vida adulta, processo este conhecido como programação metabólica ou plasticidade ontogenética.

De uma forma geral, na maioria dos modelos de programação metabólica descritos na literatura observa-se obesidade, hiperleptinemia e alterações na ingestão alimentar que podem estar associados a mudanças na circuitaria neuronal responsável por regular a ingestão alimentar e o equilíbrio energético. As principais vias centrais que regulam tais funções residem no hipotálamo, em especial no núcleo arqueado hipotalâmico (ARC), que é sensível ao status corporal de energia e orchestra as respostas para homeostasia, e no hipotálamo lateral (LH) que integra sinais para controle da ingestão alimentar homeostática e hedônica. Os sinais que atuam nessas áreas podem ter origem no sistema nervoso central (SNC), como os endocanabinóides, ou periférica como a leptina e os peptídeos gastrointestinais, que alcançam tais regiões por via humoral ou nervosa, através das aferências vagais. Esses sinais se relacionam entre si e, podem modular comportamentos e sofrer influência de estímulos externos, como a alimentação. Alguns desses circuitos foram investigados no presente trabalho no contexto da suplementação materna

com óleo de coco e complementação alimentar com o mesmo óleo na dieta da prole ao longo da vida.

## **1 REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1 Obesidade**

A obesidade é uma doença de origem multifatorial cujos determinantes compreendem tanto fatores genéticos e biológicos, quanto fatores sociais, econômicos, comportamentais e psicossociais (CAMPBELL, 2015). É uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal (WHO, 2016). Quando esse acúmulo ocorre na região abdominal, a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias tornam-se aumentadas (KWOK; LAM; XU, 2016; HEYMSFIELD; WADDEN, 2017) sendo esta a principal causa das principais desordens metabólicas típicas da obesidade (HEYMSFIELD; WADDEN, 2017).

Segundo a World Health Organization, a prevalência de obesidade mais que dobrou nos últimos 35 anos. Entre a população adulta, o número de obesos no mundo ultrapassa os 600 milhões, o que representa 13% dela. Já o número de adultos com sobrepeso é 3 vezes maior, correspondendo a 39% da população (WHO, 2016).

No Brasil, dados do sistema de vigilância em saúde mostraram que em 2014 a frequência de adultos com excesso de peso foi de 52,5%, já a de obesos ultrapassou os 17% superando a média mundial. Enquanto a frequência de obesidade foi similar entre os sexos, a de excesso de peso foi maior entre os homens (56,5%) do que entre as mulheres (49,1%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2015).

### **1.2 Contribuição da programação metabólica para o aumento da obesidade**

Alterações nutricionais ou ambientais em períodos críticos do desenvolvimento, como a gestação, a lactação (BARKER, 1990) e adolescência (CREWS; HE; HODGE, 2007), podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade na vida adulta. As primeiras associações entre características maternas e do recém-nascido com o desenvolvimento de doenças metabólicas na

vida adulta foram observadas relacionando baixo peso ao nascer e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares na idade adulta (BARKER, 1990). Hoje já existem vários estudos clínicos e experimentais confirmando essas evidências, e que estendem essa associação a outras doenças crônicas não transmissíveis (HANSON; GLUCKMAN, 2014) como diabetes tipo 2 (HALES; BARKER, 2013; JORNAYVAZ et al., 2016; KAJANTIE; OSMOND; ERIKSSON, 2017), que é hoje a principal doença endócrina.

Nos períodos críticos do desenvolvimento ocorre imaturidade orgânica, biológica e grande capacidade plástica que torna o indivíduo mais suscetível aos fatores externos e a anormalidades endógenas (BARKER, 2004; HANSON; GLUCKMAN, 2014). Porém, quando a condição inicial (*imprinting*) deixa de existir, em um momento fisiológico de menor capacidade plástica, se estabelece um novo funcionamento orgânico (BARKER, 2004), que na maioria das vezes, aumenta a predisposição ao desenvolvimento de doenças na vida adulta (HANSON; GLUCKMAN, 2014). Este fenômeno probabilístico, denominado programação metabólica, independente de modificações na sequência de DNA e pode sofrer importante influência do ambiente em que se vive.

Além do clássico baixo peso ao nascer demonstrado por Barker, também foram identificados diversos outros fatores de *imprinting* capazes de desencadear a programação metabólica. Entre eles destacam-se alterações na nutrição materna como restrição protéica ou calórica durante a lactação (PASSOS et al., 2001; QASEM et al., 2016), suplementação materna com óleos (BISPO et al., 2015; GUARDA et al., 2016) e obesidade materna induzida por dieta (KIRK et al., 2009; OBEN et al., 2010); alterações na nutrição da prole, como excesso de carboidratos (PATEL; SRINIVASAN, 2010), superalimentação neonatal (CONCEIÇÃO et al., 2011; PLAGEMANN et al., 1992), desmame precoce (LIMA et al., 2011; LIMA et al., 2013; YOUNES-RAPOZO et al., 2012). Modificações hormonais como hiperleptinemia neonatal (TOSTE et al., 2006; TREVENZOLI et al., 2007), hipoprolactinemia (MOURA et al., 2009) e a exposição a poluentes ambientais no período neonatal, como a nicotina (de OLIVEIRA et al., 2010; PINHEIRO et al., 2015a; YOUNES-RAPOZO et al., 2013), a fumaça do cigarro (LISBOA et al., 2017; SANTOS-SILVA et al., 2013) e ao bisfenol (MACKAY; PATTERSON; ABIZAID, 2017) também configuram fatores de *imprinting*.

Algumas características são comuns à maioria dos modelos de programação metabólica acima citados, independentes do insulto responsável pelo *imprinting*, seja ele nutricional,

hormonal ou ambiental, que em geral, envolvem alterações na ingestão alimentar e na homeostase energética, associadas ao sobrepeso/obesidade e hiperleptinemia, com resistência a sua ação. Portanto, o conceito de programação metabólica torna-se hoje um relevante fator que contribui para a epidemia atual de obesidade.

### **1.3 Intervenções na nutrição materna na lactação – destaque para o consumo de gorduras**

Na intenção de se tornarem mais saudáveis, as pessoas vêm aumentando o consumo de alimentos funcionais, suplementos ou complementos nutricionais. Isso é observado sobretudo em mulheres nos períodos de gestação e lactação, com a preocupação adicional de melhorar as condições de saúde (CHAMP e HOEBLER, 2009; FURUHJELM et al., 2009; WARSTEDT, 2016).

Uma prática reconhecidamente protetora de agravos a saúde do lactente é o aleitamento materno. Essa proteção ocorre tanto em curto quanto em longo prazo, no qual o contexto da programação metabólica se insere. Victora et al. (2016) mostraram que em curto prazo, o aleitamento materno até os 6 meses de vida está relacionado a maior proteção contra diarreia e infecções respiratórias com redução no número de mortes na infância. Já em longo-prazo ele está associado com redução nas chances de desenvolver excesso de peso, na incidência de diabetes mellitus tipo 2 e melhora nos parâmetros relacionados a inteligência (VICTORA et al., 2016). Uma vez que a lactação corresponde a um importante período de desenvolvimento, quando o lactente se torna mais suscetível a influências de diferentes fatores, e o leite materno constitui-se um veículo tanto para nutriente quanto para as demais substâncias as quais a mãe é exposta, o próprio leite materno pode se tornar um relevante fator programador.

As mudanças no padrão alimentar da lactante podem alterar o perfil qualitativo de nutrientes do leite materno. Estudos mostraram que o perfil de AG do leite materno reflete o perfil de AG presentes nos lipídios dietéticos ingeridos pela mãe durante a gestação (DUNSTAN et al., 2007; URWIN et al., 2012) e/ou lactação (MAZURIER et al., 2017; WARSTEDT et al., 2016). Estudos experimentais (MARTIN et al., 2016; MOUSAVI et al., 2017; SÁNCHEZ et al., 2012) e ensaios clínicos prospectivos (RYTTER et al., 2011) têm investigado os efeitos do

consumo de certos óleos durante a gestação e lactação sobre a saúde do neonato. Sánchez et al. (2012) avaliaram o efeito da suplementação materna com diferentes fontes de gordura do terço final da gestação até o 21º dia de lactação sobre a massa e composição corporal, ingestão e comportamento alimentar em ratos Wistar aos 21 e 180 dias de idade. As fontes de lipídeos empregadas foram o óleo de oliva, margarina e manteiga, administrados uma vez ao dia por gavagem intragástrica em quantidade correspondente a 30% da ingestão calórica normal diária. Após o desmame, a prole recebeu ração padrão até os 4 meses de idade, quando parte dos animais de cada grupo passaram a receber dieta hiperlipídica. Os resultados desse experimento revelaram que a suplementação materna com margarina protegeu a prole do desenvolvimento de obesidade na idade adulta, principalmente quando expostos a dieta obesogênica. O mecanismo envolvido parece estar relacionado a maior sensibilidade a leptina acompanhada de menor preferência a dieta hiperlipídica (SÁNCHEZ et al., 2012).

Nosso grupo também tem se dedicado a entender os efeitos da suplementação materna com óleos durante a lactação sobre o perfil hormonal e metabólico da prole. Nesse contexto, Guarda et al. (2014) avaliaram os efeitos da ingestão materna de uma dieta rica em óleo de linhaça (17% de óleo de linhaça + 2% de óleo de soja) ou óleo de soja (19% de óleo de soja) sobre a composição corporal e parâmetros hormonais e bioquímicos ao desmame (GUARDA et al., 2014) e inflamatórios na idade adulta (GUARDA et al., 2016). Essas alterações na dieta materna resultaram em menor ganho de peso a partir da primeira semana de lactação nos filhotes machos e fêmeas, o que pode ser atribuído ao menor conteúdo de triglicérides presentes no leite das mães dos grupos em dietas hiperlipídicas com óleo de linhaça ou soja, comparados ao grupo controle normolipídico (7% de óleo de soja na dieta) (GUARDA et al., 2014). Em contrapartida, apenas a dieta rica em ácido graxo  $\alpha$ -linolênico durante a lactação foi capaz de programar a progênie para o desenvolvimento de obesidade abdominal, dislipidemia e perfil pró-inflamatório nos machos e resistência a insulina nas fêmeas, além de hiperleptinemia em ambos os sexos (GUARDA et al., 2016).

Recentemente em nosso laboratório iniciamos o estudo de modelos de programação metabólica pela suplementação materna com óleos, onde ratas lactantes receberam diariamente 0,5g de diferentes óleos/kg de peso corporal, via gavagem intragástrica (óleos de soja, oliva, peixe ou coco). Dados preliminares mostraram que a prole macho dos grupos óleo de oliva e óleo de coco apresentaram maior massa corporal, maior percentual de gordura corporal e

hiperleptinemia aos 180 dias de idade, quando comparados ao grupo óleo de soja. Porém, apenas o grupo óleo de coco desenvolveu hiperfagia (QUITETE, 2016).

#### **1.4 Óleo de coco e sua utilização em períodos críticos do desenvolvimento**

O óleo de coco é extraído da polpa do fruto maduro e seco, a copra, que precisa ser refinado para adequar-se ao consumo humano (KUMAR, 2011). Tal processamento deixa o produto suscetível a contaminação, oxidação e perdas nutricionais. Já o óleo virgem de coco é obtido do leite de coco, num procedimento úmido com condições de temperatura controladas. Assim, esse processo preserva a qualidade nutricional do óleo (MARINA et al., 2009).

Ácidos graxos saturados de cadeia média são os principais constituintes do óleo de coco. Os mais abundantes são os ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0), caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0). Em quantidade relevante também se encontra o ácido palmítico (C16:0), ácido graxo saturado de cadeia longa (MARINA et al., 2009; EYRES, et al., 2016). O óleo de coco possui também elevado conteúdo de polifenóis que confere a ele uma atividade antioxidante (MARINA et al., 2009). O conhecido perfil de ácidos graxos do óleo de coco tem direcionado as investigações para os efeitos do seu consumo sobretudo sobre a saúde cardiovascular, pois já são bem estabelecidos os efeitos adversos que outras fontes de ácidos graxos saturados possuem sobre esse sistema. Trabalhos a cerca do tema mostram resultados ainda divergentes e nada consensuais.

O consumo prolongado de óleo de coco por humanos eleva as concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL-c, quando comparado a ingestão de alguns óleos *cis*-insaturados, comportando-se de forma semelhante a algumas gorduras saturadas (EYRES et al., 2016). Por outro lado, ensaio clínico em adultos e idosos brasileiros com história prévia de doença arterial coronariana revelou que o consumo de 13 mL de óleo de coco por dia pode ser bom adjuvante de dietas para prevenção secundária de doença cardiovascular (CARDOSO et al., 2015). Ao final dos 3 meses de intervenção o grupo que recebeu óleo de coco apresentou redução na circunferência da cintura e elevação nas concentrações de HDL-c (CARDOSO et al., 2015).

Efeitos adicionais sobre a massa corporal (GUNASEKARAN et al., 2017) e ingestão alimentar (RIZZO et al., 2016) também tem sido relatados em trabalhos com animais e humanos. Especula-se que os resultados encontrados sejam decorrentes das características metabólicas que os ácidos graxos saturados de cadeia média apresentam, já que eles são mais facilmente absorvidos e metabolizados, reduzindo o acúmulo nos tecidos extra-hepáticos e aumentando o gasto energético (GUNASEKARAN et al., 2017; ST-ONGE; JONES, 2002). No entanto, os TCM oriundos de outros tipos de óleos apresentam composição de ácidos graxos de cadeia média diferentes do óleo de coco. Enquanto nos primeiros predominam ácidos caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0), o segundo é majoritariamente composto por ácido láurico (C12:0) o que confere absorção e metabolização distinta (EYRES et al., 2016).

Os estudos que investigam as consequências do consumo de óleo de coco nos períodos de gestação e lactação ainda são incipientes. A suplementação com 1, 2 e 4mL de óleo de coco/dia em ratas durante a gestação não alterou a massa corporal das mães nem das proles, entretanto reduziu a concentração de plaquetas e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx) (NANDAKUMARAN et al., 2011). Em um outro estudo a suplementação com óleo de coco foi feita através da ração (representando aproximadamente 11% dos lipídeos totais da ração suplementada) e iniciou-se no período periconcepcional perpassando os períodos de acasalamento, gestação, lactação até a 6ª semana de vida da prole, quando foram sacrificados. A dieta não alterou o consumo alimentar da prole ao longo da vida, mas provocou menor ganho cumulativo de peso e anormalidades na disposição dos pelos da região dorsal do corpo (GUNASEKARAN et al., 2017).

### **1.5 Mecanismos centrais de regulação da ingestão alimentar**

As principais vias centrais que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético encontram-se no hipotálamo. Em roedores, em geral a neurogênese hipotalâmica ocorre entre o final da segunda e início da terceira semana de gestação, enquanto a formação dos circuitos só se completa na segunda semana pós-natal, estabelecendo-se assim a comunicação entre os neurônios (BOURET, 2012). O hipotálamo maduro é organizado anatomicamente e funcionalmente em

núcleos, destacando-se o ARC e o LH no controle da ingestão alimentar homeostática, e na integração entre estas e a via hedônica.

O ARC recebe sinais diretos e indiretos da periferia e de outras regiões do SNC, a fim de sentir o *status* de energia. Esses sinais atuam em duas populações neuronais dessa região, a saber: neurônios que expressam os neuropeptídeos orexígenos proteína relacionada ao *agouti* (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY) e neurônios que expressam os neuropeptídeos anorexígenos pró-opiomelanocortina (POMC) e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). Estes enviam projeções para outros núcleos hipotalâmicos orquestrando assim, a resposta adequada para proporcionar homeostasia (SIMPSON; MARTIN; BLOOM, 2009).

Já o LH integra muitos circuitos envolvidos na regulação do comportamento alimentar e balanço energético. Neste núcleo residem neurônios produtores de importantes sinais orexígenos, como o hormônio concentrador de melanina (MCH) e a orexina (SIMPSON; MARTIN; BLOOM, 2009), que recebem e enviam projeções para áreas do SNC relacionados a recompensa, comportamento e homeostase energética, como o núcleo accumbens (NAc), a área tegumentar ventral (VTA, *ventral tegmental area*) e o ARC (HURLEY; JOHNSON, 2014; MORTON; MEEK; SCHWARTZ, 2014).

Assim, sinais provenientes tanto da periferia (por ex. insulina, leptina e hormônios gastrointestinais) quanto do SNC (por ex. dopamina e endocanabinóides) participam da regulação central da ingestão alimentar e do gasto energético por vias diretas ou indiretas.

### 1.5.1 Leptina

A leptina é sintetizada principalmente no tecido adiposo branco e é considerada um mensageiro aferente indispensável para a transmissão do status corporal de energia (JUNG; KIM, 2013). A concentração sérica de leptina é proporcional a adiposidade corporal (PARK; AHIMA, 2015). Uma vez transcrito, traduzido e processado à proteína, este hormônio é secretado na circulação, e alcança o sistema nervoso central (SNC), seu principal sítio de ação na regulação da homeostase energética (SUTTON; MYERS; OLSON, 2016).

São descritos na literatura três mecanismos principais, mas pouco elucidados, de acesso da leptina ao SNC, a saber: o clássico transporte saturável do hormônio pela barreira hematoencefálica (MÜNZBERG; MORRISON, 2015), mediado pela isoforma curta do receptor de leptina, Ob-Ra (PARK; AHIMA, 2015); através do envio de projeções dos neurônios do ARC para o espaço perivascular de órgãos circumventriculares, como a eminência mediana; ou transporte da leptina da circulação periférica para o líquido cefalorraquidiano, através dos tanicitos e deles para os núcleos periventriculares (MÜNZBERG; MORRISON, 2015).

No SNC, a leptina atua principalmente em neurônios do ARC que expressam a isoforma longa do seu receptor (Ob-Rb) (KWON; KIM; KIM, 2016; MÜNZBERG; MORRISON, 2015), a fim de reduzir a ingestão alimentar e aumentar o gasto energético (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2010). Entre as seis isoformas conhecidas do receptor de leptina (Ob-R), a isoforma b (Ob-Rb) é a única que possui o conjunto de requisitos necessários para transdução e propagação do sinal intracelular da leptina (KWON; KIM; KIM, 2016). O Ob-Rb é um receptor com apenas um domínio transmembrana, membro da superfamília dos receptores de citocinas (KWON; KIM; KIM, 2016) que não possuem atividade quinase intrínseca (MÜNZBERG; MORRISON, 2015). A ligação da molécula de leptina a esse receptor provoca a dimerização responsável por recrutar a proteína janus quinase 2 (JAK2) para a região box 1. Esta quinase, por sua vez, sofre auto fosforilação e então, fosforila 3 diferentes resíduos de tirosina presentes no domínio intracelular do receptor. Através deles, a leptina pode desencadear diferentes vias de sinalização e recrutar diferentes efetores para mediar seus efeitos (KWON; KIM; KIM, 2016; MÜNZBERG; MORRISON, 2015).

A via JAK2-STAT3 é a principal via de sinalização pela qual a leptina exerce seus efeitos sobre a ingestão alimentar e o gasto energético (PARK; AHIMA, 2015; MÜNZBERG; MORRISON, 2015). Para recrutar e ativar o transdutor do sinal e ativador da transcrição-3 (STAT3), JAK2 fosforila o resíduo de tirosina Y1138 do Ob-Rb e também a STAT3 recrutada. Uma vez ativada, a pSTAT3 transloca para o núcleo celular onde regula a transcrição de genes dos neuropéptídeos orexígenos (-) e anorexígenos (+), principalmente do AgRP/NPY e POMC, respectivamente (KWON; KIM; KIM, 2016). No entanto, a ativação de outras vias secundárias podem ser necessárias para complementar e reforçar tais efeitos ou até mesmo contribuir para sua regulação.

Uma dessas vias complementares é mediada pela proteína adaptadora SH2B1. Essa proteína recruta substrato do receptor de insulina (IRS) para fosforilação por JAK2, com subsequente ativação da fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K) e da AKT (também conhecida como proteína quinase B). A ativação dessa via pela leptina tem como resultado final a fosforilação do fator de transcrição *forkhead box protein O1* (FoxO1) pela AKT, inativando-o. Esse fator de transcrição quando ativo no núcleo celular é capaz de estimular a transcrição do neuropeptídeo AgRP e inibir a transcrição do neuropeptídeo POMC, ações contrárias àquelas promovidas por STAT3 (KWON; KIM; KIM, 2016). Assim, parece que a inativação de FoxO1 é necessária para STAT3 mediar o efeito anorexígeno da leptina.

A AKT também promove a ativação de uma segunda via, através da fosforilação do *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Esta via culmina na ativação da proteína quinase S6 que fosforila a subunidade  $\alpha 2$  da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) em seu resíduo de serina 491, inativando-a (KWON; KIM; KIM, 2016).

Por fim, a ligação da leptina ao seu receptor Ob-Rb também é capaz de ativar a via das quinases reguladas extracelularmente (ERK 1/2, *extracellular signal-regulated kinase*). Isso ocorre com a fosforilação do receptor em seu resíduo de tirosina Y985, iniciando mais uma via para o controle da homeostase energética (KWON; KIM; KIM, 2016).

O principal regulador negativo da via da leptina é produzido em resposta a ativação de STAT3 a pSTAT3. O supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3) se liga ao resíduo de tirosina Y985 e a JAK2 impedindo a fosforilação de STAT3 (MATTACE RASO et al., 2014; MÜNZBERG; MORRISON, 2015). Outro importante regulador da sinalização do Ob-Rb é a *phosphotyrosine phosphatase-1B* (PTP1B). Ela é uma proteína citoplasmática que defosforila JAK2 (MATTACE RASO et al., 2014) em casos de excesso de leptina, também reduzindo a ativação de STAT3 (KWON; KIM; KIM, 2016).

As proteínas SOCS3 e PTP1B, responsáveis pelo feedback negativo da via da leptina, estão muitas vezes envolvidas no desenvolvimento da resistência central aos efeitos desse hormônio (JUNG; KIM, 2013; KWON; KIM; KIM, 2016). Isso acontece em casos de obesidade, quando o excesso de tecido adiposo produz quantidades também elevadas de leptina, gerando um quadro de hiperleptinemia (KWON; KIM; KIM, 2016). Outro mecanismo importante de resistência ocorre por redução do transporte da leptina pela barreira hematoencefálica (JUNG; KIM, 2013). Além dessas, outras vias relacionadas a inflamação hipotalâmica e estresse de

retículo endoplasmático também estão sendo investigadas (JUNG; KIM, 2013; KWON; KIM; KIM, 2016).

Além de regular a ingestão alimentar, por ação no ARC, a leptina também pode regular os aspectos hedônicos da alimentação. Estudos já demonstraram a expressão do Ob-Rb no VTA, na substância nigra (SN) (FIGLEWICZ et al., 2003) e no LH (JO et al., 2005). Assim, a leptina modula o sistema mesolímbico por atuar diretamente nos neurônios dopaminérgicos do VTA e da SN (DAVIS et al., 2011) ou indiretamente através de neurônios localizados no LH (MYERS et al., 2009). Estes últimos, por sua vez, projetam para o VTA, influenciando a liberação de dopamina (MYERS et al., 2009). Dessa forma a leptina reduziria a motivação, os efeitos de recompensa e, por consequência, a preferência por alimentos palatáveis (DAVIS et al., 2011; SHIMIZU et al., 2017). Tal regulação contribui para o efeito anorexígeno do hormônio de maneira dependente da sensibilidade do SNC (SHIMIZU et al., 2017).

Além da regulação do apetite em longo prazo exercido pela leptina e insulina, fatores de curto prazo provenientes principalmente do trato gastrointestinal também compõem o sistema de controle da ingestão alimentar e estão sob influência da leptina. Esses sinais convergem no hipotálamo para regular a ingestão alimentar e o gasto energético garantindo a homeostase da massa corporal.

### 1.5.2 Ação central dos hormônios gastrointestinais

Os hormônios gastrointestinais são peptídeos secretados por células enteroendócrinas específicas do trato gastrointestinal (TGI), principalmente em resposta ao conteúdo de energia ingerido e ao tipo de nutrientes presentes em sua luz. De um modo geral, eles agem tanto por meio de ações parácrinas (via terminações vagais do TGI) quanto por ações endócrinas, enviando para o SNC informações sobre a presença de nutrientes no TGI. Os hormônios gastrointestinais regulam a velocidade de esvaziamento gástrico, a motilidade intestinal, algumas secreções digestivas e a expressão de neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos através de ligação a receptores específicos em regiões-chave do SNC. Assim, eles contribuem para o controle homeostático de curto prazo da ingestão alimentar (MARIĆ et al., 2014) no que diz respeito ao

início e término de cada refeição. Entre os hormônios gastrointestinais, os de maior destaque nos estudos que avaliam o controle da ingestão alimentar, são a grelina (orexigênico) e o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1, anorexigênico).

#### 1.5.2.1 Grelina

A grelina é um hormônio peptídico sintetizado e secretado principalmente pelas células “X/A like” presentes na região de fundo da mucosa do estômago. Ela pode ser liberada para a circulação sob a forma de des-acil-grelina, C-grelina ou acil-grelina (DELPORTE, 2013), sendo esta última a forma biologicamente ativa do hormônio. A grelina é conhecida por estimular o início e a frequência da alimentação bem como o acúmulo corporal de gordura, influenciando em longo prazo a massa corporal, geralmente por mecanismos independentes (PEREZ-TILVE et al., 2011).

A acil-grelina é gerada pela acilação do terceiro aminoácido da pró-grelina (serina 3) por ação da enzima grelina o-acil-transferase (GOAT) e subsequente clivagem da pró-grelina acilada. O doador do grupo acil é obrigatoriamente um ácido graxo de cadeia média, principalmente o ácido caprílico (C8:0) e raramente o ácido cáprico (C10:0), num processo chamado de octanoilação ou decanoilação, respectivamente. A ingestão de triglicérides de cadeia média pode alterar a relação des-acil/acil-grelina em favor do aumento das concentrações dessa última forma (LEMARIÉ et al., 2015).

A grelina acilada corresponde a uma pequena fração (<10%) da grelina plasmática total. Ela circula ligada a lipoproteínas ricas em triglicérido e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) (DELPORTE, 2013). Seus efeitos biológicos são mediados por sua ligação a isoforma 1a do receptor GHS (growth hormone secretagogue, GHS-R1a). Este é um receptor acoplado a proteína Gαq (SCHELLEKENS; DINAN; CRYAN, 2010) que requer a presença do grupamento acil para o reconhecimento do ligante e ativação da cascata de sinalização (CABRAL et al., 2017). Assim, em concentrações fisiológicas, somente a acil-grelina pode se ligar e ativar este receptor (DELPORTE, 2013; CABRAL et al., 2017).

O GHS-R1a é expresso por células da hipófise e do SNC (LAVIANO et al., 2012), nas terminações vagais aferentes do trato gastrointestinal (DATE et al., 2002) e outros tecidos periféricos como pâncreas, baço, miocárdio, glândula adrenal, tecido adiposo e vasos sanguíneos (LAVIANO et al., 2012). Nesses tecidos, a grelina desempenha diversos efeitos, dentre eles o estímulo a secreção de hormônio do crescimento, a ingestão alimentar e a lipogênese, além de redução do gasto energético (PRINZ; STENGEL, 2017), contribuindo para o aumento da massa corporal.

Uma característica peculiar do GHS-R1a na regulação da ingestão alimentar é sua capacidade de funcionar tanto como monômero quanto como dímero, associando-se a outro GHS-R1a ou a receptores acoplados a proteína G, como o receptor de melanocortina 3 (MC3R), os de dopamina, o receptor de serotonina (5-HT<sub>2c</sub>, serotonin receptor 2c) (AL MASSADI et al., 2017; CABRAL et al., 2017; DELPORTE, 2013), o receptor 5 de somatostatina (CABRAL et al., 2017) e o receptor canabinoide tipo 1 (CB1-R) (AL MASSADI, 2017).

A regulação da ingestão alimentar e do gasto energético pela grelina ocorre principalmente a nível central, onde o receptor GHS-R1a é altamente expresso (MASON; WANG; ZIGMAN, 2014; SHUTO et al., 2002). Sabe-se que grande parte da grelina encontrada no cérebro é proveniente da circulação periférica (CABRAL et al., 2017). Especula-se que ela entraria no SNC através dos capilares fenestrados dos órgãos circunventriculares (CABRAL et al., 2017; MASON; WANG; ZIGMAN, 2014), como a eminência mediana, com a qual o ARC tem íntimo contato.

Dos núcleos hipotalâmicos, o ARC é o mais sensível a ação da grelina periférica (CABRAL et al., 2014; MASON; WANG; ZIGMAN, 2014). Os receptores GHS-R1a concentram-se nos neurônios AgRP/NPY+, nos quais a ligação da grelina estimula a liberação dos neuropeptídeos orexígenos e do neurotransmissor inibitório GABA (ácido gama-aminobutírico) (AL MASSADI, 2017; MASON; WANG; ZIGMAN, 2014). O mecanismo de ação envolvido na regulação da expressão desses neuropeptídeos tem como cerne a ativação da via da AMPK (DELPORTE, 2013). É através do GABA que a grelina modula de forma indireta a atividade dos neurônios POMC+, inibindo sua liberação (AL MASSADI, 2017; MASON; WANG; ZIGMAN, 2014). Além disso, ela reduz a disponibilidade de  $\alpha$ -MSH por estimular atividade da enzima prolil-carboxipeptidase, inativando-o (AL MASSADI, 2017).

No LH, a mensagem chega através de neurônios do hipocampo que expressam receptores GHS-R1a. Estes enviam projeções para os neurônios orexina+ do LH, levando a liberação desse neuropeptídeo sob estímulo da grelina (AL MASSADI, 2017). O resultado disso é o aumento da ingestão alimentar e da motivação para consumo de alimentos ricos em gordura (MASON; WANG; ZIGMAN, 2014).

Outro mecanismo proposto para ação da grelina no SNC é sua ligação a receptores presentes nos neurônios sensoriais aferentes vagais, que inervam o TGI (MASON; WANG; ZIGMAN, 2014). Este sinal chega ao núcleo do trato solitário (NTS) e segue para o ARC através de vias noradrenérgicas, resultando na estimulação dos neurônios AgRP/NPY+ (MASON; WANG; ZIGMAN, 2014). Assim, a grelina aumenta a ingestão alimentar tanto por meio de ação direta no ARC, quanto por meio de ação indireta através do NTS.

Receptores de grelina também são expressos nos neurônios dopaminérgicos do VTA, aumentando a liberação de dopamina no NAc (MASON; WANG; ZIGMAN, 2014). A consequência disso é o aumento da ingestão alimentar com reforço na procura e no valor de recompensa para alimentos palatáveis (MASON; WANG; ZIGMAN, 2014), configurando o aspecto hedônico da grelina sobre a ingestão alimentar.

Os efeitos da grelina sobre a ingestão alimentar também são dependentes da ativação do sistema endocanabinóide, via receptores CB1. Estes interagem de forma mútua e sinérgica, de modo que a grelina estimula a síntese de endocanabinóides e estes modulam a ativação de AMPK induzida por grelina (AL MASSADI, 2017).

A grelina também tem efeitos diretos sobre a massa corporal, estimulando a lipogênese, reduzindo a atividade da AMPK e aumentando a expressão dos fatores de transcrição PPAR $\gamma$ , SREBP1 e das enzimas acetil-coenzima A-carboxilase e ácido graxo sintase (DELPORTE, 2013). Já foi demonstrado que ela tem a capacidade de alterar a preferência da utilização de substrato energético para carboidratos, em detrimento da gordura (CABRAL et al., 2017).

A secreção e as concentrações plasmáticas de grelina, bem como seus efeitos podem ser dependentes do estado nutricional dos indivíduos. Estudos mostram que a secreção e as concentrações plasmáticas de grelina em indivíduos obesos costumam ser baixas, porém constantes (TSCHOP et al., 2001, BRIGGS, 2010), perdendo a característica pulsátil observada em pessoas eutróficas. Somado a isso, observa-se também uma resistência central ao efeito orexígeno da grelina (BRIGGS et al., 2010), como um mecanismo de proteção para conter o

ganho de peso. No entanto, essa resistência parece ser restrita a ingestão alimentar, uma vez que sua capacidade lipogênica não é alterada (PEREZ-TILVE et al., 2011).

#### 1.5.2.2 GLP-1

O GLP-1 é um hormônio derivado do processamento pós-traducional do peptídeo pró-glucagon. As células que o sintetiza expressam RNAm do precursor e a enzima pró-hormônio convertase específica para catalisar tal modificação. Assim, apenas as células  $\alpha$  do pâncreas, neurônios do núcleo do trato solitário e hipotálamo no SNC e as células L presentes na camada epitelial do íleo distal e cólon secretam esse hormônio (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

O GLP-1 exerce seus efeitos incretina e anorexigênico através da ligação ao seu receptor (GLP-1R). Esse pertence a família dos receptores acoplados a proteína G (BAGGIO; DRUCKER, 2007), podendo ativar vias de sinalização dependentes ou independentes de AMPc, dependendo do tecido em que ele é expresso (RONVEAUX; TOMÉ; RAYBOULD, 2015). Ele está presente em tecidos periféricos e centrais como pâncreas (células  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ ), trato gastrointestinal, gânglio nodoso do nervo vago, hipófise, hipotálamo, tronco cerebral entre outros (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

No SNC, o GLP-1R pode ser ativado tanto pelo GLP-1 produzido localmente quanto pelo produzido pelo intestino. Este pode chegar ao SNC por difusão através da barreira hematoencefálica e órgãos circumventriculares. A mensagem emitida pelo GLP-1 também pode chegar ao SNC pelos ramos aferentes vagais que partem do gânglio nodoso para o núcleo do trato solitário. Dessa região, a informação é retransmitida para o hipotálamo e outras regiões (BAGGIO; DRUCKER, 2007). Essa última via parece ser dominante para os efeitos centrais do GLP-1, já que sua meia-vida na circulação é extremamente curta (PRINZ; STENGEL, 2017).

Quatro diferentes isoformas de GLP-1 podem ser secretadas, entre elas estão as isoformas GLP-1-(7-37) e GLP-1-(7-36)NH<sub>2</sub> que são as formas biologicamente ativas. Esta última é a principal isoforma circulante em humanos e a que possui maior meia-vida por conter um grupamento amida (BAGGIO; DRUCKER, 2007). A secreção de GLP-1 é estimulada pelo contato das células L com nutrientes presentes na luz intestinal, sobretudo ácidos graxos e

glicose. Assim, a concentração plasmática desse hormônio é dependente do tamanho e da composição da refeição (BAGGIO; DRUCKER, 2007). Porém, a primeira fase da secreção bifásica do GLP-1, que ocorre aproximadamente 15 minutos do início da refeição, independe desse estímulo. Segue-se então uma segunda fase mais tardia e com duração mais prolongada que a primeira (PRINZ; STENGEL, 2017). A leptina estimula a secreção de GLP-1 pelas células L enteroendócrinas. Receptores de leptina também são encontrados no gânglio nodoso do nervo vago e em neurônios do NTS que expressam GLP-1R, promovendo a liberação local de GLP-1 que atua em regiões hipotalâmicas envolvidas no controle do apetite (RONVEAUX; TOMÉ; RAYBOULD, 2015). Por outro lado, a sinalização periférica do GLP-1R também parece influenciar nos efeitos da leptina sobre a ingestão alimentar e o ganho de peso corporal em ratos (RONVEAUX; TOMÉ; RAYBOULD, 2015). Portanto, parece que a leptina pode potencializar a secreção de GLP-1 e seus efeitos anorexígenos, e o GLP-1 também pode mediar os efeitos da leptina sobre a homeostase energética.

Ambos grelina e o GLP-1 interagem na regulação da ingestão alimentar, porém o mecanismo envolvido nessa regulação ainda não está claro. O que se sabe é que a grelina pode regular a disponibilidade do GLP-1R na membrana plasmática, reduzindo a ligação de um agonista a este receptor (RONVEAUX; TOMÉ; RAYBOULD, 2015).

O efeito anorexígeno do GLP-1 é mediado por dois mecanismos principais que se complementam: redução da velocidade de esvaziamento gástrico e da secreção de ácido clorídrico (BAGGIO; DRUCKER, 2007), sendo responsável por diminuir a ingestão alimentar em curto prazo e estimulação direta dos neurônios POMC/CART+ e inibição indireta dos neurônios NPY/AgRP+ no ARC (KATSURADA; YADA, 2016). Assim o GLP-1 reduz a ingestão alimentar por diminuir o tamanho e a duração da refeição, bem como por aumentar o intervalo de tempo entre as refeições (BARRERA et al., 2011).

Também foi vista uma ação indireta do GLP-1 sobre os neurônios POMC+ no ARC quando esse hormônio foi co-administrado com leptina em doses que, individualmente, não afetam a ingestão alimentar. Nesse estudo houve um aumento da expressão de POMC no hipotálamo, mediado por sinais que partem dos neurônios do rombencéfalo (onde o NTS está localizado), resultando em redução da ingestão alimentar nos ratos tratados com os dois hormônios simultaneamente (AKIEDA-ASAI et al., 2014).

Barrera et al., 2011 revelaram que a ação central do GLP-1 vai além do controle sobre a ingestão alimentar em curto prazo. Eles mostraram que tanto a redução da produção de pró-glucagon no NTS quanto o bloqueio dos receptores centrais de GLP-1 resultaram no desenvolvimento de hiperfagia e maior acúmulo de gordura corporal em ratos adultos alimentados com dieta padrão e/ou rica em gordura. Esses achados reforçam a importância da ação do GLP-1 a nível central no controle da ingestão alimentar e do balanço energético em longo-prazo (BARRERA et al., 2011).

A inativação de GLP-1 é realizada pela enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP4) e se inicia assim que o hormônio é secretado. Esta enzima está presente em vários tecidos, incluindo o fígado e os vasos que drenam a mucosa intestinal (BAGGIO; DRUCKER, 2007; RONVEAUX; TOMÉ; RAYBOULD, 2015), gerando os metabólitos inativos GLP-1-(9-37) e GLP-1-(9-36)NH<sub>2</sub> que são excretados pelo rim (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

### 1.5.3 O sistema endocanabinóide (SEC)

O SEC regula o gasto energético e a ingestão alimentar, tanto a nível central quanto periférico (CARDINAL, 2012; 2014; WATIKIS e KIM, 2015), o que faz dele uma importante via para o desenvolvimento da obesidade. A resposta a sinais homeostáticos e hedônicos é principalmente modulada pelos endocanabinóides produzidos em populações neuronais específicas do LH. Neste núcleo, a leptina influencia a síntese e a resposta dos endocanabinóides (CRISTINO et al., 2013; JO et al., 2005).

O SEC é composto pelos receptores canabinóides, seus agonistas endógenos e as enzimas que catalisam sua biossíntese e degradação (NAUGHTON et al., 2013; WATIKIS; KIM, 2015). Ele foi inicialmente descoberto por seu envolvimento no mecanismo de ação do  $\Delta^9$ -tetra-hidrocanabinol (THC), princípio ativo da maconha (*Cannabis sativa*) (DEVANE; AXELROD, 1994), que age sobre os receptores canabinóides 1 (WATIKIS; KIM, 2015) produzindo efeitos psicotrópicos (DEVANE; AXELROD, 1994) e estimulantes do apetite (KIRKHAM, 2009).

Os receptores canabinóides mais conhecidos são os de tipo 1 (CB1-R) e tipo 2 (CB2-R). O primeiro está distribuído por quase todo o SNC, mas também em células de órgãos periféricos

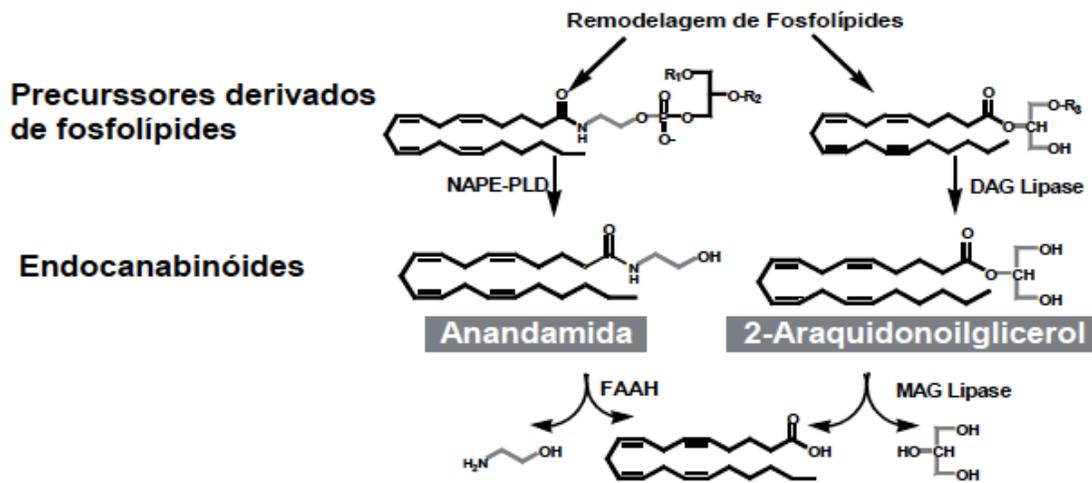
como tecido adiposo branco (TAB) (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006) fígado (ALVHEIM et al., 2014) e nas terminações vagais do trato gastrointestinal (WATIKIS; KIM, 2015), favorecendo a lipogênese, a sensação de fome e a diminuição da sensibilidade a insulina e a leptina (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006). Já os CB2-R estão presentes principalmente em células do sistema imune desempenhando efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios, mas podem também ser encontrados em pequena quantidade no SNC, ossos, músculo e coração (WATIKIS; KIM, 2015).

Ambos CB1-R e CB2-R possuem 7 domínios transmembrana acoplados na face interna da membrana à proteína G inibitória ( $G\alpha_{i/o}$ ), principalmente. Assim, a ligação do agonista a um desses receptores gera mudanças conformacionais na estrutura do receptor com consequente dimerização e ativação da subunidade  $\alpha_{i/o}$ . Esta inibe a atividade adenilato ciclase e a produção de monofosfatocíclico de adenosina (AMPC) (WATIKIS; KIM, 2015) enquanto estimula a via da MAPK (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006), resultando na ativação da ERK 1/2. Dessa forma os canabinóides regulam a expressão de genes relacionados a diferenciação, proliferação, migração, transformação, sobrevivência e morte celular (DHOPEHWARKAR; MACKIE, 2014; HOWLETT, 2005). A ativação do CB1-R também exerce efeitos sobre canais iônicos presentes na membrana celular. Os canais de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  voltagem-dependentes e os canais de potássio retificadores de influxo são então regulados pelo CB1-R para modular a excitabilidade celular e, conseqüentemente, a liberação pré-sináptica de neurotransmissores. (HOWLETT, 2005; IRVING; MCDONALD; HARKANY, 2008).

No hipotálamo, o CB1-R apresenta-se em pequena quantidade (HERKENHAM et al., 1991) no núcleo paraventricular (PVN), co-expresso com o hormônio liberador de corticotrofina (CRH); no ARC, com as células que expressam o transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (CART); no núcleo ventromedial (VMN), com a pré-pró-orexina (WATIKIS; KIM, 2015); no LH, com o hormônio concentrador de melanina (MCH) e nos neurônios positivos para o fator esteroideogênico 1 (SF1) que também expressam receptores de leptina e medeiam a atividade do sistema nervoso simpático (SNS) (CARDINAL et al., 2014). O CB1-R também está presente no sistema mesolímbico e no tronco cerebral (HERKENHAM et al., 1991), modulando o gasto energético e principalmente a ingestão alimentar. Além disso, está envolvido na regulação de funções cognitivas, emocionais e no reforço, que levam a dependência química (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006).

Os agonistas endógenos mais bem caracterizados que se ligam aos receptores canabinóides são o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) e a N-araquidoniletanolamida - Anandamida (AEA) (WATIKIS; KIM, 2015) (figura 1). Eles são sintetizados a partir de ácidos graxos (AG) derivados da dieta, principalmente do ácido araquidônico, AG poli-insaturado  $\omega$ -6 (ALVHEIM et al., 2014; NAUGHTON et al., 2013; WATIKIS; KIM, 2015), que são incorporados aos fosfolípídios de membrana e depois utilizados pela maquinaria celular por remodelagem das mesmas (WATIKIS; KIM, 2015). Para isso utilizam, dentre outras enzimas, a diacilglicerol lipase sn-1-seletiva (DAGL) e uma fosfolipase D seletiva para N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD) (NAUGHTON et al., 2013; WATIKIS; KIM, 2015). O 2-AG é o EC mais abundante nos tecidos e correlaciona-se positivamente com o índice de massa corporal (IMC) e adiposidade intra-abdominal em humanos obesos (NAUGHTON et al., 2013). Ele se liga com afinidade semelhante a ambos os receptores canabinóides, enquanto a anandamida é um fraco agonista para CB2-R (WATIKIS; KIM, 2015).

Figura 1- Formação e inativação dos endocanabinóides



Fonte: FRANCISCHETT & ABREU, 2006.

Outras N-aciletanolaminas, derivadas dos ácidos graxos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e oléico (C18:1), também possuem sua síntese catalisada pela enzima NAPE-PLD. O que determina se a enzima vai servir a um ou a outro é a disponibilidade do substrato. Apesar desses mediadores lipídicos possuírem estrutura química semelhante a dos endocanabinóides eles não podem se ligar aos receptores canabinóides. Apesar disso, eles podem influenciar a ingestão alimentar e metabolismo energético através da ligação a outros receptores como o receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) (GEURTS et al., 2015).

Os ECs podem agir de forma autócrina ou parácrina (WATIKIS e KIM, 2015) e logo ter sua ação interrompida por degradação. De forma semelhante, nos neurônios eles são recaptados e, em seguida, metabolizados a compostos inativos (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006). Esse processo ocorre por meio principalmente das vias enzimáticas que utilizam as enzimas monoacil glicerol lipase (MAGL) e ácido graxo amida hidrolase (FAAH), sendo a primeira mais específica para a 2-AG e a segunda para a anandamida (NAUGHTON et al., 2013; WATIKIS; KIM, 2015).

No TAB, o CB1-R é expresso apenas por adipócitos em diferenciação e adipócitos maduros (VETTOR; PAGANO, 2009). Sua ativação promove acúmulo de gordura por meio do aumento da atividade da enzima lipoproteína lipase (LPL), aumento da captação celular de glicose (por aumentar a translocação de GLUT4 para a membrana), diminuição da biogênese e atividade mitocondrial e por estímulo à diferenciação de pré-adipócitos a adipócitos (VETTOR; PAGANO, 2009), podendo induzir a obesidade hipertrófica (ALVHEIM et al., 2014) ou hiperplásica. O compartimento de gordura visceral mostra-se mais expressivo para síntese e atuação dos ECs (VETTOR; PAGANO, 2009).

O SEC é ativado “sob demanda”, sendo os EC prontamente sintetizados e liberados em respostas a estímulos fisiológicos (ALVHEIM et al., 2014). O jejum de curto prazo, exposição a alimentos palatáveis e situações de estresse estimulam o SEC (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006). Ainda o aumento no fornecimento de substrato para a biossíntese dos EC, maior expressão de CB1-R e atividade das suas enzimas de biossíntese, bem como redução na degradação dos EC, pode tornar este sistema hiperativo (NAUGHTON et al., 2013).

A hiperativação do SEC está diretamente relacionada à hiperfagia, com preferência por alimentos palatáveis (CRISTINO; PALOMBA; DI MARZO, 2014; DI MARZO; LIGRESTI; CRISTINO, 2009), redução do gasto energético e maior acúmulo de gordura (CARDINAL et al., 2014; WATIKIS; KIM, 2015), além de distúrbios endócrino-metabólicos (ALVHEIM et al.,

2014; NAUGHTON et al., 2013; WATIKIS; KIM, 2015), como hiperleptinemia (CARDINAL et al., 2014) e alterações no metabolismo da glicose (ALVHEIM et al., 2014; CARDINAL et al., 2014; NAUGHTON et al., 2013).

Existe uma íntima relação entre a ação central da leptina e o sistema endocanabinóide. Di Marzo e colaboradores (2001) observaram que uma única dose intravenosa de leptina em ratos normais foi capaz de reduzir em cerca de 50% os níveis hipotalâmicos de 2-AG e anandamida, sem alterar a atividade das principais enzimas de síntese e degradação (DI MARZO et al., 2001).

## JUSTIFICATIVA

Na tentativa de melhorar a qualidade de vida, muitas pessoas, principalmente mulheres, agregam em sua rotina, a ingestão de alimentos funcionais, mesmo sem seu efeito bioativo ser completamente conhecido, o que atualmente pode ser tratado como um modismo. A substituição das fontes tradicionais de gordura, como o óleo de soja e as gorduras saturadas de origem animal na dieta ocidental, por outras não habituais como o óleo de coco, consideradas mais saudáveis, vem ganhando popularidade. As vezes, essa substituição também tem sido adotada de forma pontual durante os períodos críticos do desenvolvimento como a gestação e lactação, momento em que geralmente a mãe tem maior preocupação em estar saudável.

Pouco se sabe sobre as consequências futuras do uso do óleo de coco por indivíduos expostos a este óleo no período de desenvolvimento. Sabe-se que diferentes fatores de imprinting resultam em modificação no comportamento alimentar, e que este pode ser um dos mecanismos para o ganho ponderal anormal e o subsequente desenvolvimento da obesidade. Assim, para um melhor entendimento dessas modificações, propomos avaliar os mecanismos centrais envolvidos no controle do apetite em um modelo experimental de suplementação materna com óleo de coco, que conhecidamente leva a hiperfagia da prole adulta. Também temos a intenção de investigar o que acontece nos mesmos circuitos centrais de regulação da ingestão alimentar quando essa prole é exposta ao mesmo fator de imprinting durante toda a sua vida, ou seja óleo de coco na dieta pós-desmame ofertada a prole de forma contínua.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o ganho de peso e o comportamento alimentar de ratos Wistar machos adultos amamentados por mães que receberam suplementação com óleo de coco durante todo o período da lactação, bem como em animais que continuaram recebendo este óleo na ração durante toda a vida.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Monitorar a evolução ponderal da prole ao longo da vida e a ingestão alimentar a partir do desmame;
- Testar a preferência por dietas hiperglicídica e hiperlipídica aos 175 dias de idade;
- Estudar a composição corporal aos 180 dias de idade;
- Investigar os seguintes parâmetros envolvidos com a ingestão alimentar aos 180 dias de idade:
  - Concentrações de leptina no plasma e no tecido adiposo branco;
  - Conteúdo das proteínas da via de sinalização da leptina (ObR, pJAK2, pSTAT3 e SOCS3) no núcleo arqueado do hipotálamo;
  - Conteúdo do receptor do peptídeo gastrointestinal GLP-1 (GLP-1R) no núcleo arqueado do hipotálamo;
  - Conteúdo das enzimas de síntese e degradação de endocanabinóide e de seu receptor (DAGL $\alpha$ , FAAH e CB1-R) no hipotálamo lateral.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido utilizando ratos Wistar alojados em gaiolas de polipropileno com forragem apropriada, mantidas no biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina sob condições controladas de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro-escuro de 12h (7:00-19:00 h) e sistema de exaustão de ar. O número de animais mantidos por gaiola foi de 1 (gestação), 1 mãe com sua respectiva ninhada (lactação) e 4 (animais adultos de segmento). A água filtrada e a ração oferecidas foram consumidas sob livre demanda.

Todos os procedimentos de cuidado animal obedeceram a lei nº 11.794, de outubro de 2008, que regula os procedimentos para o uso de animais em atividades de ensino e pesquisa no território nacional. O desenho experimental executado neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (IBRAG/UERJ) e registrado sob o número CEUA/001/2014.

#### 3.1 Modelo de *imprinting* por suplementação materna com óleo de coco.

Ratas fêmeas nulíparas de aproximadamente 3 meses de idade foram acasaladas com ratos machos da mesma linhagem na proporção de 2:1, durante 2 semanas. Ao final desse período, as fêmeas grávidas foram acomodadas em gaiolas individuais até o nascimento da prole (dia pós-natal 0, PN0). Como esquematizado no Quadro 1, no primeiro dia pós-natal (PN 1) as proles foram ajustadas para 6 filhotes machos por mãe. A partir desse momento cada lactante, juntamente com sua ninhada, foi aleatoriamente atribuídas a um dos 2 grupos experimentais, a saber:

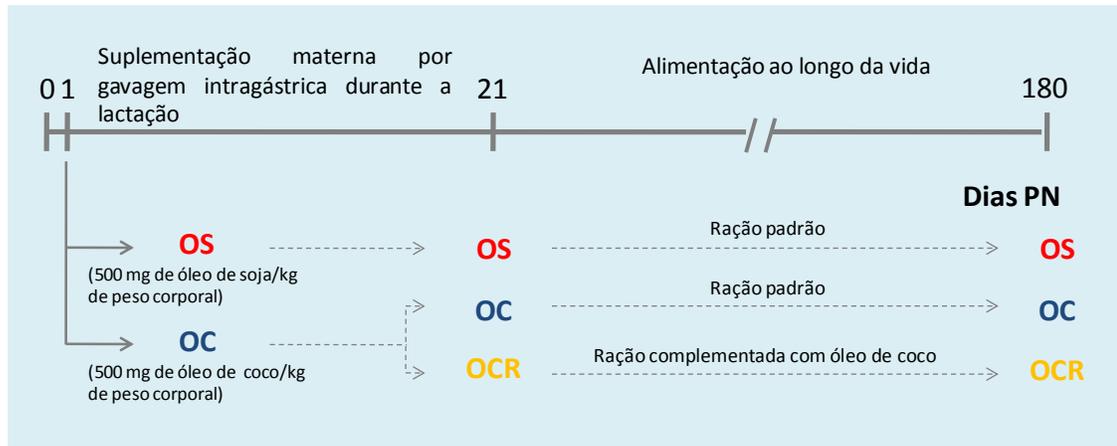
- grupo óleo de soja (OS) - animais cujas mães receberam óleo de soja na dose de 500 mg/kg de peso corporal, por gavagem intra-gástrica, durante os 20 dias da lactação (PN 1 a PN 20);

- grupo óleo de coco (OC) - animais cujas mães receberam óleo de coco na dose de 500 mg/kg de peso corporal, por gavagem intra-gástrica, durante os 20 dias da lactação (PN 1 a PN 20);

Ao desmame (PN 21), os animais do grupo OC foram subdivididos em 2 diferentes grupos, de acordo com a tipo de ração consumida sob livre demanda até os 180 dias de idade. A partir de então, o estudo passou a ser composto pelos seguintes grupos experimentais:

- grupo óleo de soja (OS, 9 ninhadas) - animais cujas mães receberam óleo de soja durante a lactação e que a partir do desmame passaram a consumir ração comercial padrão para roedores (Nuvilab-NUVITAL Nutrientes LTDA, Paraná, Brasil);
- grupo óleo de coco (OC, 7 ninhadas) – animais cujas mães receberam óleo de coco durante a lactação e que a partir do desmame passaram a consumir ração comercial padrão para roedores (Nuvilab-NUVITAL Nutrientes LTDA, Paraná, Brasil);
- grupo óleo de coco ração (OCR, 7 ninhadas) – animais cujas mães receberam óleo de coco durante a lactação e ração complementada com óleo de coco (66,6% do total de lipídios da ração).

Quadro 1 - Delineamento experimental, destacando a intervenção nutricional realizada em cada grupo nos períodos de lactação e pós-desmame



Legenda: Delineamento experimental do modelo de programação pela suplementação materna com óleo de coco durante a lactação, e complementação alimentar com este óleo ao longo de toda a vida. Ratas lactantes receberam gavagem intragástrica com óleo de soja – grupo OS ou óleo de coco – grupo OC (500mg/kg) durante todo o período da lactação. Ao desmame o grupo OC foi subdividido em 2 grupos: os animais alimentados com ração padrão ao longo da vida – grupo OC, assim como o grupo OS, e os alimentados com ração complementada com óleo de coco até os 180 dias de idade. OS- óleo de soja; OC- óleo de coco; OCR- óleo de coco ração.

Fonte: A autora, 2017.

### 3.2 Preparo da ração complementada com óleo de coco

A ração complementada com óleo de coco foi produzida no próprio laboratório. Sua base foi ração padrão (Nuvilab®, NUVITAL Nutrientes LTDA, Paraná, Brasil) consumida pelos ratos, em sua forma farelada. A esta ração foram adicionadas quantidades suficientes de amido de milho, proteína texturizada de soja e óleo de coco (coconut oil from *Cocos nucifera*, Chem Cruz®, Santa Cruz Biotechnology) a fim de manter a composição nutricional e a fonte de macronutrientes semelhantes aos da ração padrão (normocalórica, normoproteica e normolipídica e normoglicídica), alterando parcialmente somente a fonte lipídica. Também foram acrescidos mix de minerais, vitaminas, aminoácidos e antioxidante segundo as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN- 93M) para roedores. (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Os ingredientes utilizados no preparo da ração complementada com óleo de coco estão detalhados a seguir (Quadro 2).

Quadro 2 - Ingredientes e composição de macronutrientes da ração complementada com óleo de coco.

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

CHO- carboidratos, PTN – proteína, LIP – lipídeos, BHT – Butilhidroxitolueno.

Fonte: QUITETE, 2016.

Todos esses ingredientes foram homogeneizados em batedeira industrial, por cerca de 20 minutos. Água morna foi adicionada a massa até que ela atingisse a consistência necessária para formação de novos *pellets*. Estes foram então levados à estufa de secagem por 24h, a 50°C. Após a secagem, a ração foi armazenada a 4° C. A cada semana um novo lote de ração era produzido, a fim de garantir sua qualidade nutricional e manter sua segurança microbiológica.

### 3.3 Avaliação do estado nutricional

O estado nutricional foi avaliado periodicamente através das medidas de massa corporal e ingestão alimentar. Adicionalmente, a massa de gordura visceral também foi medida no dia da eutanásia.

### 3.3.1 Massa corporal

A massa corporal dos animais foi monitorada durante toda a vida por pesagem em balança digital, em intervalos de 4 dias do desmame até os 180 dias de idade.

### 3.3.2 Ingestão alimentar

A quantidade de ração oferecida e a quantidade de ração restante em cada gaiola foi medida e registrada a cada 4 dias. Assim, a ingestão alimentar de cada animal foi estimada pela diferença entre a ração inicial e a ração final, dividido pelo número de animais presentes em cada gaiola e pelo intervalo de dias entre cada pesagem.

### 3.3.3 Avaliação da massa de gordura visceral

Os compartimentos de gordura mesentérica, gonadal e retroperitoneal foram dissecados após o sacrifício e imediatamente pesados em balança de precisão. A massa de gordura visceral (MGV) é então resultante da soma do peso desses compartimentos de gordura.

## **3.4 Teste de preferência alimentar**

O teste de preferência alimentar foi realizado aos 175 dias de idade, sob jejum de 12h (8:00-20:00 h). Após esse período os animais dos grupos OS, OC e OCR, contidos em caixas com 2 animais de cada ninhada, foram expostos por um período de 12 h (ciclo escuro, 20:00-8:00

h) as dietas hiperglicídica (rica em açúcar simples) e hiperlipídica (miscelânea de açúcar simples e gordura saturada, com predominância desta última) (Quadro 3), simultaneamente, para avaliação da preferência. O consumo destas rações foi registrado em 2 momentos: 30 minutos após o início do teste, para avaliação da voracidade e ao final de 12 h de exposição (PINHEIRO et al., 2015b). Os resultados foram expressos pelo consumo (g)/ animal.

Quadro 3 - Composição de macronutrientes das rações palatáveis

	Composição em g/100g		
	Padrão	Hiperglicídica	Hiperlipídica
Carboidratos	66,0	78,9	58,9
Proteína	23,0	14,3	14,3
Lipídios	11,0	6,8	26,8
Valor energético (Kcal)	455	461	561

Fonte: PINHEIRO et al., 2015b

### 3.5 Eutanásia

A eutanásia foi realizada aos 180 dias de idade, após jejum de 12 horas, por punção cardíaca sob efeito anestésico (90mL/kg de peso de cloridrato de quetamina com 15mL/kg de peso de cloridrato xilazina, ip.). O sangue foi coletado em tubos de sangue contendo EDTA e então centrifugado (3000 rpm/20 minutos/4°C) para obtenção do plasma. Este foi armazenado a -20°C até a realização das análises. Após a exsanguinação, o cérebro foi rapidamente dissecado e armazenado a -20°C por 24h; após esse período, foi conservado a -80°C. Os compartimentos de gordura visceral também foram dissecados e imediatamente pesados, aliquotados em microtubos e congelados em nitrogênio líquido. Todos os tecidos, exceto o plasma, foram armazenados a -80°C.

### 3.6 Determinação das concentrações de leptina plasmática e tecidual

A concentração plasmática de leptina foi medida utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA), colorimétrico, com reatividade específica para leptina produzida em ratos (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). O nível de leptina nas amostras de tecido adiposo retroperitoneal também foi mensurada após extração prévia em tampão RIPA. Todas as amostras foram incluídas num único ensaio. O coeficiente de variação intraensaio foi de 2,13% com sensibilidade de detecção de 0,08 ng/mL. Os resultados foram expressos em ng/mL.

### 3.7 Isolamento dos núcleos hipotalâmicos

Os cérebros congelados foram cortados em sentido coronal utilizando criostato (Hyrax C25, Zeiss, Stuttgart Alemanha) a temperatura de  $-12^{\circ}$  C. As regiões de interesse foram localizadas tomando como ponto de referência o *bregma* (PAXINOS E WATSON, 1998). Assim, a técnica de *punch* foi aplicada para isolar o núcleo arqueado (ARC) e o hipotálamo lateral (LH) no corte coronal localizado entre o *bregma* -1,6 e -2,6 mm. Os núcleos foram armazenados a  $-80^{\circ}$ C até a realização das análises.

### 3.8 Determinação do conteúdo de proteínas por western blotting

As proteínas da via de sinalização da leptina, do receptor de GLP-1 e do SEC foram quantificados pelo método de western blotting empregando os seguintes procedimentos:

Extração de proteínas - as proteínas do ARC e do LH foram respectivamente extraídas em 80 e 60 mL de tampão RIPA (50mM TRIS pH 7,4; 150mM NaCl; 0,1% SDS, 50mM NaF, 30mM pirofosfato de sódio, 5mM-EDTA, 1% Triton X-100), adicionado de ortovonadato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e coquetel inibidor de proteases (Complete®

EDTA-free - Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). Para isso utilizou-se processador ultrassônico (SONICS Vibra-Cell® modelo VCX 130, Newtown, CT, EUA) em 2 ciclos de 10 seg., separados por um intervalo de 15 seg. e amplitude de 40%. Os homogenatos resultantes não precisaram ser centrifugados.

Dosagem de proteína – a determinação da concentração de proteína dos homogenatos foi realizada utilizando o kit de ensaio colorimétrico BCA (BCA Protein Assay Kit - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), juntamente com uma curva padrão de proteína pré-diluída (Pierce® BSA Protein Assay Standard Pre-Diluted Set - Thermo Fisher Scientific Inc.) segundo orientações do fabricante. A leitura do ensaio foi feita em leitor de microplaca a 562nm.

Preparo das amostras – as amostras foram diluídas a partir do homogenato-estoque para possuírem a mesma quantidade de proteína no mesmo volume a ser pipetado no gel. Ao homogenato diluído foi adicionado 20% de tampão contendo 2-mercaptoetanol, alcançando, assim, o volume final determinado. As amostras diluídas foram, então, vortexadas e deixadas por 1 h em temperatura ambiente para desnaturação das proteínas.

Western blotting – as amostras diluídas foram pipetadas e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 10 ou 12%, dependendo do peso molecular da proteína alvo. Uma vez separadas, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare, Amersham Place, Bucks, Inglaterra). Em seguida, foram incubadas por 45 minutos em solução com 5% de albumina sérica bovina (BSA - Sigma-Aldrich) diluída em T-TBS (20mM Tris, 0,5M NaCl - pH7,5 + 0,1% de tween-20) a fim de inibir possíveis ligações inespecíficas. Na sequência, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário, específico para a proteína que se deseja marcar, overnight a 4°C. Após esse período as membranas foram lavadas com solução T-TBS e incubadas com anticorpo secundário biotilado, por 1 hora. Em seguida foram feitas novas lavagens com T-TBS e uma nova incubação com estreptavidina conjugada a peroxidase (GE Healthcare), durante 1 hora. Por fim, outras lavagens com T-TBS foram realizadas para então a membrana ser revelada. Estas foram expostas ao reagente ECL (ECL® - GE Healthcare) e submetidas a um sistema de detecção por quimioluminescência (ImageQuant LAS 500 - GE Healthcare), que também capturava as imagens geradas. Todas as incubações foram realizadas em temperatura ambiente, sob suave e constante agitação. As imagens das bandas foram quantificadas por densitometria com o auxílio do programa *Image J*, versão 1.6.0 (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA). A proteína  $\beta$ -actina foi utilizada

como controle interno de todos os ensaios. Os detalhes da técnica específicos para cada proteína –alvo estão descritos no Quadro 4.

Quadro 4 - Proteínas marcadas por western blotting e suas condições específicas de ensaio

Tecido	Marcador (PM)	Quantidade de proteína por slot ( $\mu\text{g}$ )	Concentração do gel de poliacrilamida (%)	Concentração do AC primário	Concentração do AC secundário
Núcleo arqueado	Ob-R (100-125 kDa)	10	12	1:1000*	1:10000
	pJAK2 (128 kDa)			1:500*	1:10000
	pSTAT3 (91-86 kDa)			1:500*	1:10000
	SOCS3 (~30 kDa)			1:500*	1:7000
	GLP-1R (~53kDa)	30	12	1:200**	1:5000
Hipotálamo lateral	CB1-R (60-53 kDa)	10	10	1:100**	1:7000
	DAGL $\alpha$ (115 kDa)	10	10	1:500**	1:10000
	FAAH (~63 kDa)	20	12	1:500**	1:10000

Nota: Todos os anticorpos foram diluídos em T-TBS; as incubações ocorreram em temperatura ambiente com a membrana sob leve agitação. PM: peso molecular; AC: anticorpo. \* Santa Cruz biotechnology Inc., Dallas, TX, EUA; \*\*Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA  
Fonte: A autora, 2017.

### 3.9 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados e tiveram sua significância testada no programa *GraphPad Prisma*, versão 5.0 (San Diego, CA, EUA). As evoluções de ingestão alimentar e massa corporal do desmame a vida adulta foram avaliadas por análise de variância bivariada (two way ANOVA). A análise de variância univariada (one way ANOVA) foi aplicada para avaliar os 3 grupos experimentais aos 180 dias de idade. Já o ANOVA bivariada (two way ANOVA) foi utilizado nas análises do teste de preferência alimentar (ração hiperglicídica x hiperlipídica) nos 3 grupos de estudo (OS x OC x OCR) para avaliar a influência que o tratamento recebido ao longo

da vida poderia ter sobre a escolha da ração (interação preferência alimentar x tratamento). O pós-teste de Student-Newman-Keuls foi aplicado quando as análises de variância indicavam alguma diferença significativa. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

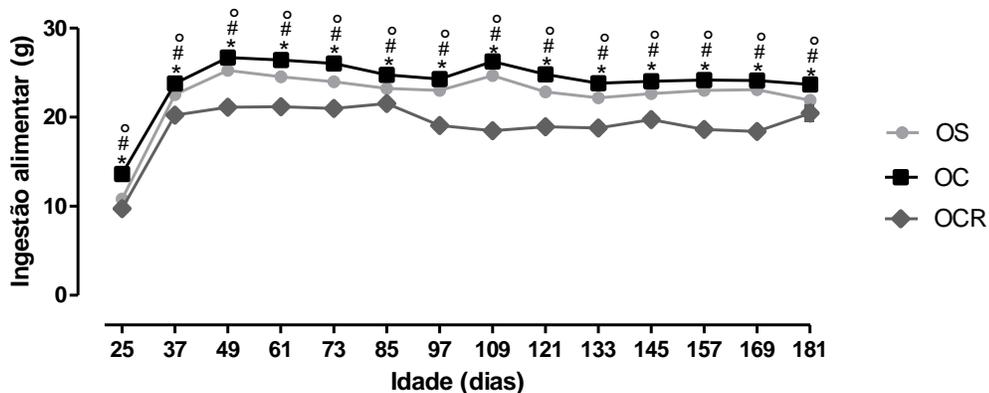
Os animais provenientes de todas as ninhadas foram incluídos na avaliação do estado nutricional, enquanto no teste de preferência selecionamos aleatoriamente apenas 2 animais de cada ninhada. Nas demais análises utilizamos 1 animal de cada ninhada para todos os grupos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da evolução da ingestão alimentar e massa corporal do período do desmame até a idade adulta (180 dias):

Na evolução da ingestão alimentar representada na Figura 2, podemos observar que já nos primeiros dias após o desmame os grupos estudados diferiram significativamente quanto a quantidade de ração consumida. Enquanto o grupo OC apresentou maior ingestão alimentar no PN25 comparado ao grupo OS (OC vs OS, +26%) e OCR (OC vs OCR, +40%), o grupo OCR exibiu menor ingestão alimentar quando comparado ao grupo OS (OCR vs OS, -10 %). Este perfil dos 3 grupos se manteve ao longo de todo o seguimento (PN 180: OC vs OS, +8%; OCR vs OS, -7%; OC vs OCR, +16%). Assim, caracterizamos os animais do grupo OC como hiperfágicos e os animais do grupo OCR como hipofágicos, quando comparados ao grupo OS.

Figura 2- Evolução da ingestão alimentar

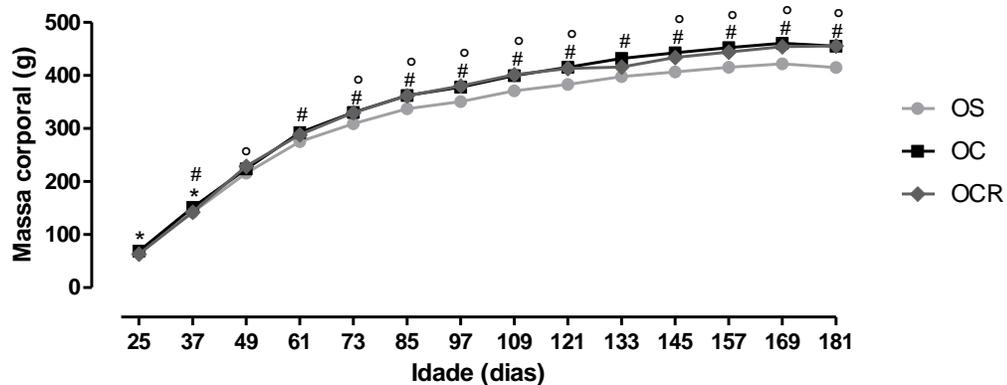


Legenda: Evolução da ingestão alimentar (PN 25 a PN 180) dos animais expostos indiretamente ao óleo de soja (OS, n= 36) ou óleo de coco (OC, n= 28) durante a lactação e ao óleo de coco durante toda a vida (OCR, n= 28). Resultados expressos como média  $\pm$ EPM. \*OC vs OCR; #OC vs OS; °OCR vs OS ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2017.

A evolução da massa corporal ao longo do tempo (PN25 a PN180 - Figura 3), mostrou que um padrão de maior massa corporal nos grupos que receberam óleo de coco, foi mais evidente a partir do PN73. Assim, ambos os grupos OC e OCR chegaram aos 180 dias de idade com massa corporal aproximadamente 10% maior que o grupo OS, sem existir diferenças entre eles (OC:  $455,2 \pm 7,6$ ; OCR:  $455,6 \pm 8,9$  g).

Figura 3- Evolução da massa corporal



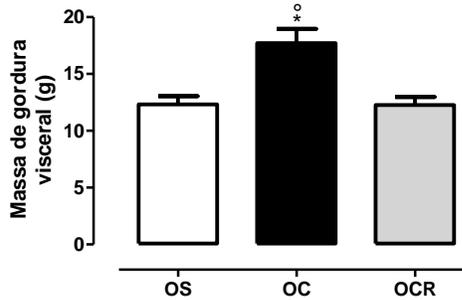
Legenda: Evolução da massa corporal (PN 25 a PN 180) dos animais cujas mães foram expostas ao óleo de soja (OS, n= 36) ou óleo de coco (OC, n= 28) durante a lactação e ao óleo de coco durante toda a vida (OCR, n= 28). Resultados expressos como média  $\pm$ EPM. \*OC vs OCR; #OC vs OS; °OCRvs OS ( $p < 0,05$ )

Fonte: A autora, 2017.

#### 4.2 Avaliação da massa de gordura visceral aos 180 dias de idade:

Em PN 180 (Figura 4), o grupo OC apresentou maior conteúdo de gordura visceral em relação ao grupo OS (OC vs OS, +44%). Os grupos OS e OCR mostraram MGTV semelhantes entre si (OS:  $12,33 \pm 0,72$ ; OCR:  $12,27 \pm 0,71$ ).

Figura 4- Massa de gordura visceral aos 180 dias de idade



Legenda: MGV dos grupos óleo de soja (OS, n= 36), óleo de coco (OC, n=28) e óleo de coco ração (OCR, n= 28), em PN180. Resultados como média  $\pm$ EPM. \*vs OS; °vs OCR(p< 0,05)

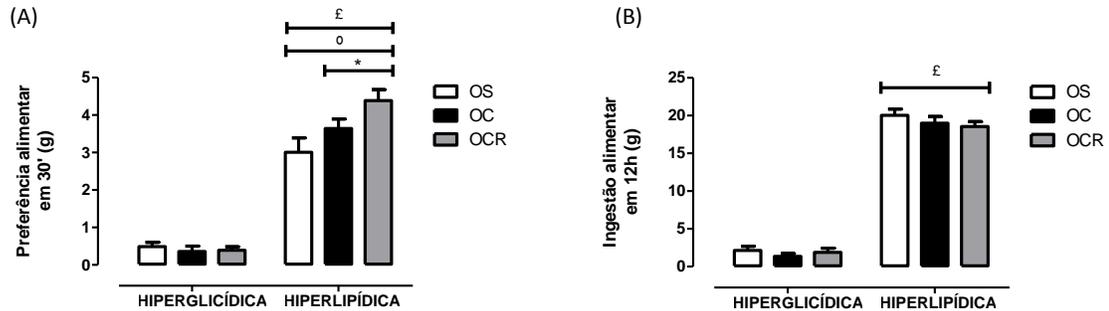
Fonte: A autora, 2017.

#### 4.3 Preferência alimentar por dietas palatáveis na vida adulta:

Nos primeiros 30 minutos de realimentação antecedida por jejum de 12h (Figura 5A), os três grupos consumiram maior quantidade da ração hiperlipídica comparado a ração hiperglicídica (dieta:  $F_{1,92} = 268.99$   $P < 0,001$ ). A preferência pela dieta hiperlipídica do grupo OC não diferiu significativamente do grupo OS (OS:  $3,0 \pm 0,39$ ; OC:  $3,64 \pm 0,30$ ). No entanto, a preferência pela ração rica em gordura foi maior no grupo OCR quando comparado aos grupos OS (OCR vs OS, +21%) e OC(OCR vs OC, +20%), indicando interação entre a dieta e o tratamento (dieta x tratamento:  $F_{2,92} = 5.00$ ,  $P = 0,0087$ ).

Ao final das 12h de oferta dos alimentos palatáveis (Figura 5B), o consumo da dieta rica em gordura permaneceu significativamente maior que a ingestão da dieta rica em açúcar entre todos os grupos testados (dieta:  $F_{1,92} = 585.66$ ,  $P < 0,0001$ ). Porém, a diferença observada nos primeiros 30 minutos de oferta das rações palatáveis desaparece ao longo do período de exposição, de modo que, o consumo final resultante da dieta preferida é semelhante entre os grupos OS, OC e OCR.

Figura 5- Preferência por dietas palatáveis aos 175 dias de idade



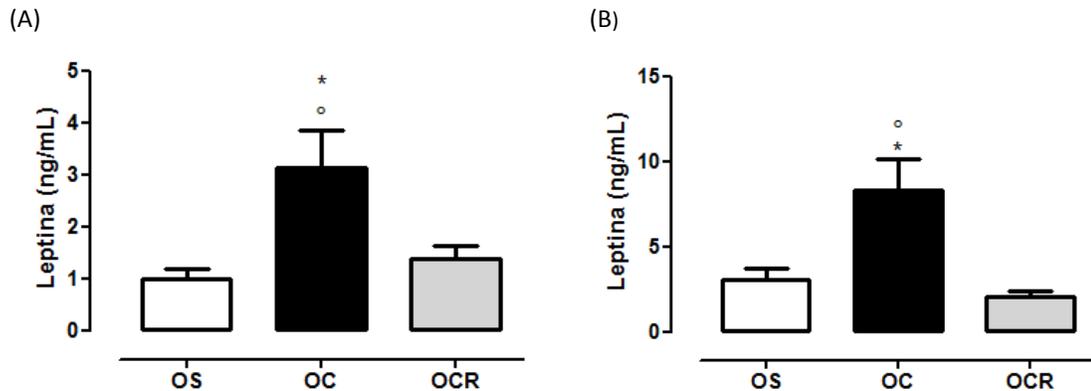
Legenda: Preferência alimentar em PN 175 dos animais programados pela exposição materna ao óleo de soja (OS, n=18) ou óleo de coco (OC, n=14) durante a lactação, e exposição ao óleo de coco a partir do desmame (OCR, n= 14). Ingestão após 30 minutos (A) e em 12h (B) da oferta das rações palatáveis. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. \*OC vs OCR; °OCR vs OS; £hiperglicídica vs hiperlipídica ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2017.

#### 4.4 Concentração de leptina plasmática e tecidual:

A leptina plasmática de jejum (Figura 6A) dos animais adultos (PN 180) foi maior no grupo OC (+3x) em relação ao grupo OS. Não foram verificadas diferenças nos níveis de leptina entre os grupos OS e OCR (OS:  $0,98 \pm 0,19$ ; OCR:  $1,39 \pm 0,24$  ng/ml). O mesmo perfil foi encontrado quanto a concentração de leptina no tecido adiposo retroperitoneal (Figura 6B), onde foi observado maior concentração no grupo OC comparado ao grupo OS (+1,7x), sem diferenças entre os grupos OS e OCR (OS:  $3,05 \pm 0,70$ ; OCR:  $2,05 \pm 0,35$  ng/ml).

Figura 6- Concentrações plasmática e tecidual de leptina



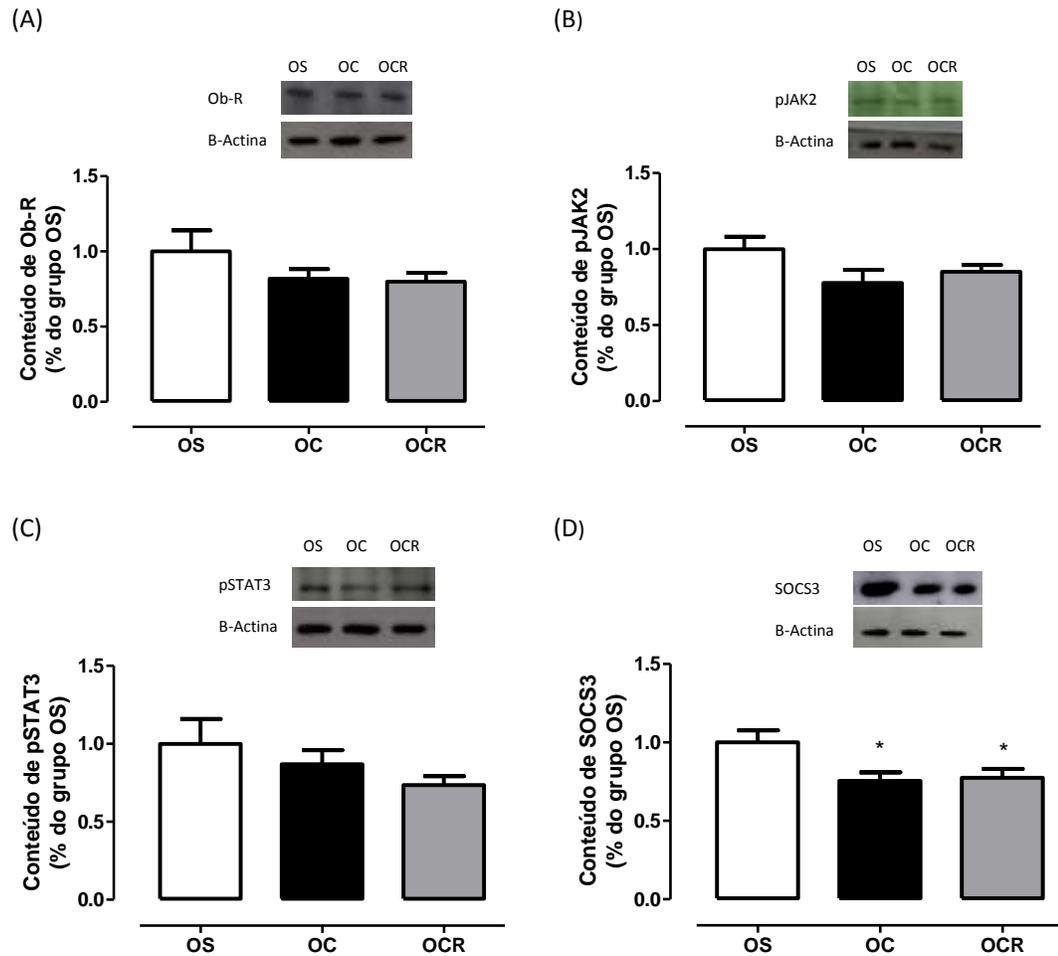
Legenda: Concentração de leptina no plasma (A) e tecido adiposo retroperitoneal (B) em PN180. Resultados expressos como média  $\pm$ EPM. Grupo óleo de soja (OS, n= 9), óleo de coco (OC, n= 7) e óleo de coco ração (OCR, n= 7). \*vs OS; °vs OCR ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2017.

#### 4.5 Reguladores de curto e longo prazo da ingestão alimentar: a via de sinalização da leptina, receptor de GLP-1 e o sistema endocanabinóide (SEC):

A Figura 7 exhibe o conteúdo das proteínas da via de sinalização da leptina no ARC. Não houve diferença entre os três grupos para o conteúdo de Ob-R (Figura 7A), pJAK2 (Figura 7B), assim como para a proteína pSTAT3 (Figura 7C). Já a expressão da proteína SOCS3 (Figura 7D) mostrou-se significativamente reduzida nos grupos OC (-23%) e OCR (-25%), em relação ao grupo OS.

Figura 7- Conteúdo de proteínas da via de sinalização da leptina no ARC

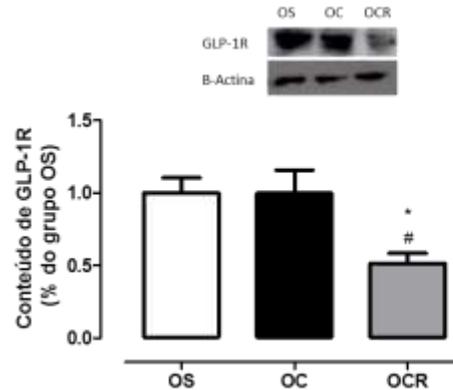


Legenda: Conteúdo das proteínas da via de sinalização da leptina – Ob-R (A), pJAK2 (B), pSTAT3 (C) e SOCS3 (D) – no núcleo arqueado do hipotálamo dos animais, aos 180 dias de idade, cujas mães foram expostas ao óleo de soja (OS, n=9) ou óleo de coco (OC, n= 7) durante a lactação, e ao óleo de coco após desmame (OCR, n= 7). Resultados como média  $\pm$ EPM. \* vs OS ( $p < 0,05$ )

Fonte: A autora, 2017.

Também observamos menor expressão no conteúdo de GLP-1R no ARC (Figura 8) apenas no grupo OCR quando comparado ao grupo OS (-49%); os grupos OC e OCR não diferiram entre si (OS Vs OC,  $P=0,983$ ).

Figura 8- Conteúdo de GLP-1R no ARC

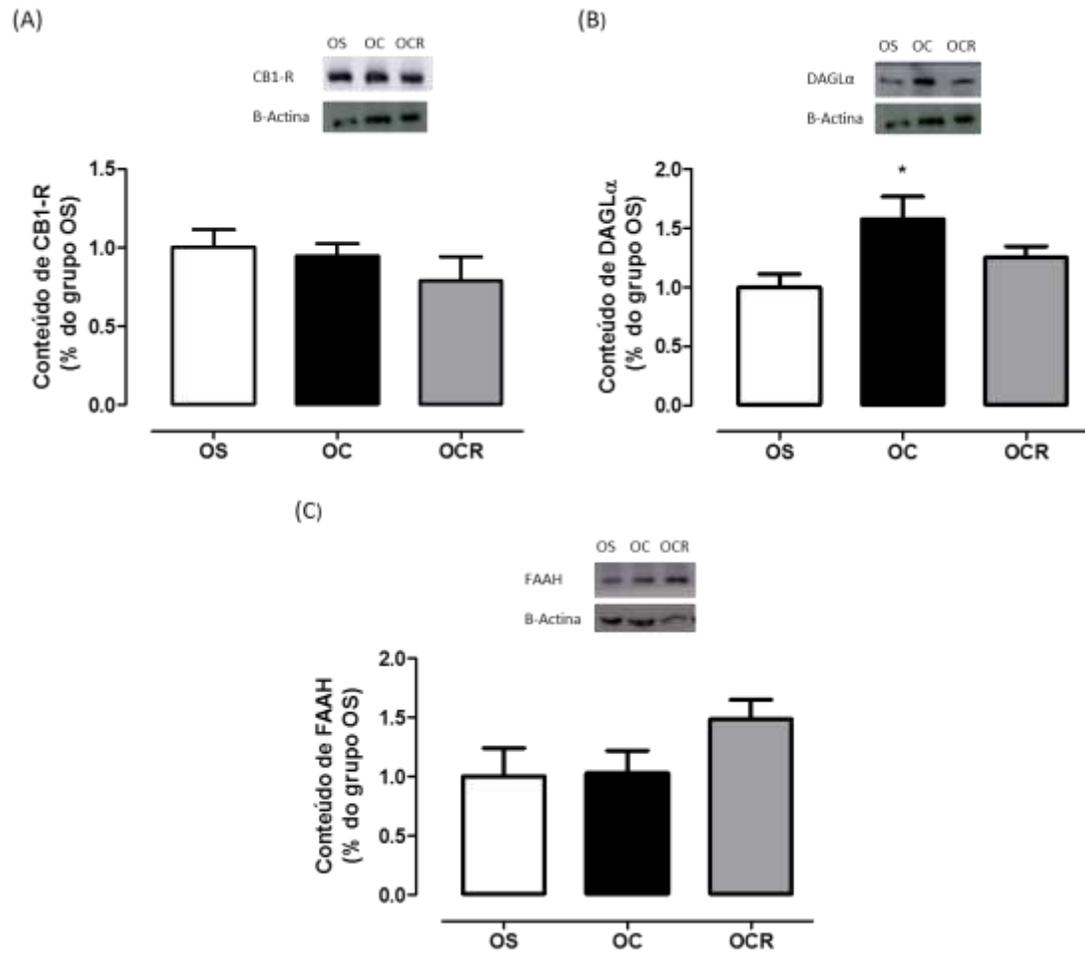


Legenda: Conteúdo do receptor do hormônio gastrointestinal GLP-1(GLP-1R) no ARC aos 180 dias de idade. Resultados expressos como média  $\pm$ EPM. Grupo óleo de soja (OS, n= 9), óleo de coco (OC, n=7) e óleo de coco ração (OCR, n= 7).

Fonte: A autora, 2017.

Avaliamos o conteúdo de proteínas do SEC no LH (Figura 9). Entre as proteínas analisadas observamos somente maior expressão no conteúdo da enzima de síntese DAGL $\alpha$  (Figura 9B), quando comparado ao grupo OS (+58%), sem alteração no grupo OCR.

Figura 9- Conteúdo de proteínas do SEC no LH



Legenda: Conteúdo do receptor, enzimas de síntese e degradação do sistema endocanabinóide, CB1-R (A), DAGL $\alpha$  (B), FAAH(C), no hipotálamo lateral dos animais aos 180 dias de idade. Resultados expressos como média  $\pm$ EPM. Grupo óleo de soja (OS, n= 9), óleo de coco (OC, n=7) e óleo de coco ração (OCR, n= 7). \* vs OS ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2017.

## 5 DISCUSSÃO

A principal fonte lipídica tanto da dieta de humanos quanto da usada nas rações para animais é o óleo de soja. Nosso grupo tem mostrado que a substituição, parcial ou total, do óleo de soja na dieta materna durante a lactação por uma outra fonte não usual, como o óleo de coco (QUITETE, 2016) ou óleo de linhaça (GUARDA et al., 2016), programa as proles adultas para distúrbios endócrino-metabólicos quando comparado ao óleo de soja. Assim, neste trabalho o grupo experimental que recebeu óleo de coco ajuda a compreender alguns dos mecanismos destas alterações e serve de alerta para as consequências tardias da troca transitória da fonte mais comum de óleo na alimentação (soja) por uma outra fonte, mesmo que considerada mais saudável, no período crítico do desenvolvimento (lactação).

A suplementação materna com óleo de coco durante a lactação aumentou a concentração de triglicerídeos e a densidade calórica no leite das mães suplementadas com óleo de coco (QUITETE, 2016), podendo ser este um dos fatores de *imprinting* no nosso modelo de programação. Além disto, o transporte de ácido láurico através do leite materno deve estar aumentado no nosso modelo pois este é o principal ácido graxo presente no óleo de coco. Observamos que as proles de mães suplementadas com óleo de coco apresentaram hiperfagia desde os primeiros dias pós-desmame (PN25). O maior ganho de massa corporal no grupo OC só se estabeleceu entre PN49 e PN61, mantendo-se maior que o grupo OS ao longo de toda a vida. Assim, a maior ingestão acumulada ao longo de algumas semanas pode ter contribuído para a maior massa corporal e maior adiposidade visceral observada no grupo OC.

As proles cujas mães receberam óleo de coco na lactação e continuaram recebendo este óleo na ração (grupo OCR) apresentam hipofagia ao longo da vida e menor massa de gordura visceral aos 180 dias de idade, apesar de terem um ganho de massa corporal maior que o grupo OS e igual ao grupo OC. Assim, a maior massa corporal da prole OCR pode ser explicado por possível aumento de gordura subcutânea ou até mesmo massa magra, sendo portanto metabolicamente melhor adaptado.

A ingestão de triglicerídeos de cadeia média (TCM) tem sido associado à menor ingestão alimentar e redução da massa corporal (BACH; BABAYAN, 1982; FERREIRA et al., 2014; ST-ONGE; JONES, 2002). Tais efeitos são principalmente atribuídos aos ácidos caprílico (C8:0) e

cáprico (C10:0), que juntos correspondem, a cerca de 14% dos ácidos graxos presentes no óleo de coco. O ácido graxo predominante neste óleo é o ácido láurico (C12:0) – aproximadamente 48% - (LOCKYER; STANNER, 2016), que também é reconhecido por reduzir a ingestão alimentar e proporcionar características metabólicas mais favoráveis que os ácido graxos de cadeia longa (MONTGOMERY et al., 2013). Como o grupo OCR foi exposto ao óleo de coco durante toda a vida, é possível que estes efeitos tenham contribuído para a hipofagia observada.

As concentrações plasmáticas de leptina, bem como o seu conteúdo no tecido adiposo retroperitoneal foram proporcionais a massa de gordura visceral em cada grupo estudado. A ingestão de óleo de coco ao longo de toda a vida preveniu não só o aumento da adiposidade, mas também o aumento da leptinemia nos animais programados. A hiperfagia associada ao excesso de leptina plasmática apresentados pelo grupo OC é característico de resistência central aos efeitos anorexígenos desse hormônio (BONOMO et al., 2007; LIMA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011). Por isso, investigamos a expressão de algumas proteínas da via clássica da leptina no ARC. Não verificamos alterações no conteúdo de Ob-R, pJAK2 e pSTAT3 no ARC em ambos os grupos OCR e OC. A única diferença encontrada foi uma menor expressão de SOCS3 nesses dois grupos experimentais. Portanto, a resistência a leptina desenvolvida pelos animais do grupo OC, é possivelmente mediada por outra via de sinalização da leptina que não a via clássica JAK/STAT ou ainda por dificuldade de acesso desse hormônio ao SNC.

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a dificuldade de acesso da leptina ao SNC em obesos hiperleptinêmicos; o mais antigo e aceito baseia-se na característica saturável do transporte desse hormônio através da barreira hematoencefálica realizado pela isoforma curta do receptor de leptina, o Ob-Ra (Burguera et al., 2000; JUNG; KIM, 2013). Outro mecanismo descrito envolve o transporte da leptina do plasma para o hipotálamo através dos tanicitos, que revestem a interface de contato do ARC com a eminência mediana, constituindo o primeiro sítio de acesso e ação da leptina ao hipotálamo. Há evidências de que os tanicitos captam a leptina na eminência mediana e a transportam para o fluido cerebrospinal, sendo redistribuída para o hipotálamo. Esse mecanismo é mediado por uma isoforma ainda não identificada de Ob-R (BALLAND et al., 2014), que pode contribuir para o desenvolvimento de resistência por dificuldade de acesso do hormônio aos neurônios-alvo.

A via da PI3K/AKT é uma via alternativa candidata a estar reduzida nos animais OC, que também poderia contribuir para a resistência a leptina. Essa via alternativa inibe a ativação do

fator de transcrição FoxO1. Este fator, quando em sua forma ativa (desfosforilada), estimula a transcrição dos neuropeptídeos NPY e AgRP (KWON; KIM; KIM, 2016) e inibe a de POMC (principal mediador dos efeitos anorexígenos da leptina) por se ligar diretamente a pSTAT3, impedindo a sua ligação à região promotora dos seus gene-alvo (YANG et al., 2009; MA et al., 2015). Assim, para que os efeitos anorexígenos da leptina mediados por pSTAT3 ocorram é necessário que a via da PI3K/AKT esteja igualmente funcionante. É possível que nosso trabalho esta via esteja reduzida assim como FoxO1 esteja aumentada na prole OC, explicando o seu maior consumo de ração.

Além disso, a via da AKT também promove a ativação da via mTOR/proteína kinase S6 que resulta na inativação da AMPK com consequente acúmulo de produtos responsáveis pela anorexia mediada por esta via no ARC. Em camundongos com obesidade induzida por dieta, a administração de leptina não reduziu a ingestão alimentar num período de 24h. Esse efeito foi associado a AMPK $\alpha$ 2 normal e ativação de STAT3 no ARC, sugerindo que somado a outros reguladores da AMPK, alterações no funcionamento dessa via também contribuem para a resistência central a leptina (MARTIN et al., 2006). Assim, em nossos animais OC, a resistência ao efeito central da leptina pode ser resultado de uma redução da AKT, e consequentemente da mTOR, com maior ativação da AMPK.

A proteína SOCS3 é estimulada pela via JAK/STAT responsável por realizar o feedback negativo da mesma, de forma que níveis elevados dessas proteínas estão associados a resistência a leptina, comumente observado em obesos (BJØRBÆK et al., 1999). Entretanto, nos animais do grupo OC observamos menor expressão de SOCS3, demonstrando que esta não é a causa da resistência a leptina. Por outro lado, os animais OCR mostraram-se sensíveis a leptina muito provavelmente um reflexo da sua composição corporal, especialmente pela menor gordura visceral.

Uma outra possibilidade para compreender a hiperfagia observada no grupo OC é a maior expressão de DAGL $\alpha$  no LH. Essa enzima catalisa a síntese do endocanabinóide mais abundante, o 2-AG, sugerindo que sua biossíntese possa estar aumentada. Como não conseguimos quantificar o conteúdo de sua principal enzima de degradação, a MAGL, não sabemos se a degradação de 2-AG está menor na prole OC. Por outro lado, o conteúdo da enzima FAAH, enzima que degrada principalmente a anandamida, não mostrou-se alterado, além de não termos quantificado o conteúdo de sua enzima de síntese, a NAPE-PLD. Apesar das limitações técnicas,

o maior conteúdo de DAGL $\alpha$  no LH é um importante achado, uma vez que pode explicar a maior ingestão alimentar nos animais programados. Esse resultado corrobora Cristino e colaboradores (2013), que observaram em camundongos adultos obesos, com resistência a leptina, maior marcação para DAGL $\alpha$  nos neurônios produtores de orexina no LH. Adicionalmente, a imunomarcação para MAGL não foi alterada nesses animais obesos, assim como os níveis de EC (CRISTINO et al., 2013).

O LH desempenha um importante papel no controle e integração de sinais homeostáticos e hedônicos na regulação do comportamento alimentar (HURLEY; JOHNSON, 2014; MORTON; MEEK; SCHWARTZ, 2014). Essa integração parece ser mediada pelo SEC (DI MARZO; LIGRESTI; CRISTINO, 2009) no LH, onde verificou-se que a leptina também pode regular a síntese dos mediadores desse sistema (JO et al., 2005). Além disso, estudos de eletrofisiologia mostraram que as duas principais populações de neurônios encontradas no LH (MCH+ e orexina+) estão envolvidas nesse controle (JO et al., 2005; BECKER et al., 2017).

Os neurônios do LH que produzem MCH expressam Ob-Rb e recebem inervações gabaérgicas de diferentes regiões do cérebro, como o ARC e o NAc. Na presença de leptina, o neurotransmissor GABA é liberado, hiperpolarizando o neurônio pós-sináptico MCH+. Já em camundongos que não produzem leptina (*ob/ob*), a concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular aumenta, favorecendo a síntese de EC, que via CB1-R presentes nos terminais pré-sinápticos gabaérgicos, bloqueiam a liberação de GABA. Assim, os ECs aumentam a liberação do MCH, resultando em aumentando da ingestão alimentar (JO et al., 2005). Os animais programados pelo óleo de coco, hiperleptinêmicos, hiperfágicos e com um possível aumento de 2-AG no LH talvez também apresentem uma maior liberação de MCH.

Já os neurônios orexina+ são afetados de maneira indireta pela ausência de leptina(*ob/ob*) ou por resistência a sua ação. Nessas condições há um remodelamento das entradas que inervam os neurônios orexina+, em vez de predominantemente glutamatérgicas (excitatórios) elas tornam-se majoritariamente gabaérgicas (inibitórios), expressando CB1-R em ambos os casos. Assim, enquanto em condições de homeostase, os EC produzidos pelos neurônios pós-sinápticos orexina+ inibem a liberação de orexina, em condições de deficiência de leptina eles estimulam a liberação desse neuropeptídeo orexígeno (BECKER et al., 2017). Portanto, é possível que a resistência a leptina dos animais OC esteja comprometendo o correto arranjo sináptico do hipotálamo, influenciando as funções dos ECs e levando a maior secreção de orexina.

Cristino e colaboradores (2013) demonstraram haver remodelamento sináptico das aferências que inervam os neurônios orexina+ do LH de roedores adultos obesos, tanto com deficiência genética a leptina (*ob/ob*) quanto com resistência a leptina no ARC induzida por dieta. Estes autores demonstraram que prejuízo na sinalização mTOR/S6K1 da leptina nos neurônios do ARC é um dos responsáveis pelo rearranjo das aferências que se conectam com os neurônios orexina+ no LH. O fato dos animais alimentados com dieta *high fat* terem apresentado resistência a leptina no núcleo arqueado, mas não no LH, reforçam essas interpretações (CRISTINO et al., 2013). Esses mesmos autores observaram que o 2-AG atua nos CB1-R localizados nos neurônios gabaérgicos dos animais obesos com resistência a leptina, “desinibindo” os neurônios orexina+ pós-sinápticos.

No presente trabalho, sugerimos que a hiperfagia associada a hiperleptinemia se deva ao desenvolvimento de resistência a leptina no grupo OC, possivelmente, levando ao aumento na expressão de NPY e AgRP e a redução na expressão de POMC no ARC, que através de estímulos positivos no LH aumentam a produção de MCH e orexina.

Contrário ao observado no grupo OC, o grupo OCR não apresentou alteração no conteúdo de proteínas do SEC. Assim, supomos que o SEC nesses animais esteja normal, o que pode ser atribuído a uma sensibilidade hipotalâmica normal a leptina, visto a importância desse hormônio no rearranjo e funcionamento de fibras que inervam os neurônios anorexígenos presentes no LH e que sofrem influência direta dos EC via CB1-R.

Sabe-se que a hiperatividade do SEC está relacionada a hiperfagia e a preferência por alimentos palatáveis, principalmente os ricos em gordura. Essa preferência tem sido associada particularmente aos níveis de 2-AG no hipotálamo (HIGUCHI et al., 2011,2012). Ao realizarmos um teste para avaliar a preferência alimentar após um jejum de 12h, todos os grupos preferiram a ração hiperlipídica, tanto em 30 minutos quanto em 12 horas após o início da oferta. Surpreendentemente, o grupo OC, apesar de apresentar sobrepeso, resistência a leptina e possivelmente um SEC disfuncional no LH, não diferiu do grupo controle (OS) quanto ao teste de comportamento alimentar. Uma possível explicação para esse achado seria uma inibição do sinal que parte do LH para as regiões que compõem o sistema mesolímbico, impedindo assim a produção, liberação e/ou ação de dopamina, ou ainda que o funcionamento do SEC no sistema mesolímbico não esteja alterado.

De forma inesperada, o grupo OCR, hipofágico em vigência de ração padrão e com menor adiposidade central, apresentou maior voracidade alimentar com um maior consumo da ração hiperlipídica após 30 minutos do início do teste, comparados com o grupo OS e OC. É possível que estes animais tenham uma falha no sistema de recompensa dopaminérgico cerebral. Anteriormente, em nosso laboratório, demonstramos que ratos obesos programados pela exposição a fumaça de cigarro na lactação apresentam, na vida adulta, maior preferência a dieta rica em gordura tanto em 30 minutos como em 12 horas (PINHEIRO et al., 2015b). Tal achado foi associado as seguintes alterações no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico: diminuição do conteúdo de tirosina hidroxilase (TH, enzima limitante da produção de dopamina) no VTA e redução de TH e do receptor dopaminérgico tipo 2 no NAc (Pinheiro et al., 2015), indicando menor produção e efeito da dopamina neste modelo de programação. No presente estudo sugerimos que o grupo OCR tenha uma menor síntese de dopamina no VTA ou menor síntese, secreção e/ou ação de dopamina no NAc. Assim a determinação do sistema dopaminérgico de recompensa cerebral em nosso modelo experimental poderá nos dar alguma pista sobre a preferência alimentar dos animais OCR comparados aos outros dois grupos. Como a maior ingestão da dieta hiperlipídica pela prole OCR ocorreu só de forma aguda, e a quantidade total de ração ingerida em 12 horas não foi diferente entre os grupos, decidimos avaliar a ação central de um peptídeo gastrointestinal que inibe a ingestão alimentar de curto prazo (finalizando a refeição), o GLP-1. Detectamos menor conteúdo de GLP-1R no ARC, indicando que esses animais devem apresentar uma menor resposta ao GLP-1, mas que parece ser compensada ao longo do período de avaliação, uma vez que os reguladores de logo prazo, como a leptina, aparentemente tem sua ação preservada.

Apesar de, aparentemente, o grupo OCR ser melhor adaptado (hipofágico, menor adiposidade e normoleptinêmico), o achado de maior voracidade pela dieta palatável sugere que estes animais podem se tornar obesos caso expostos a uma dieta hiperlipídica.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados encontrados no presente estudo e da crescente utilização de alimentos funcionais e suplementos alimentares por mulheres em períodos críticos do desenvolvimento, como a lactação, é importante um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos para uma maior conscientização a respeito de possíveis consequências futuras para seus filhos, sobretudo quando se trata do uso transitório, impulsionado pelo modismo.

A suplementação materna com óleo de coco durante o período da lactação levou a consequências nocivas para a composição corporal e para a regulação central da ingestão alimentar, favorecendo o desenvolvimento da obesidade, mas que, em sua maioria, podem ser evitadas quando o fator de *imprinting* permanece ao longo da vida, reforçando o princípio de que a programação metabólica é, de fato, um fenômeno adaptativo.

Recentemente, a SBEM (Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia) e a ABESO (Associação Brasileira para o Estudo de Síndrome Metabólica e Obesidade) posicionaram-se contra o uso terapêutico do óleo de coco para emagrecimento, baseadas no fato de ainda não existirem evidências científicas sobre sua eficácia e pela escassez de estudos bem controlados com o seu uso em humanos, que mostram um número reduzido de participantes. E ainda, por poder apresentar potenciais riscos para a saúde, uma vez que há grande associação entre consumo de ácidos graxos saturados e o risco de doenças cardiovasculares.

Apesar de diferentes estudos experimentais demonstrarem efeitos benéficos do óleo de coco melhorando desordens da obesidade (ALVES et al., 2017; DEOL et al., 2015; SHIRAZI et al., 2014), um estudo mostrou que o uso de óleo de coco através de dieta high-fat, reduziu os níveis de adiponectina em camundongos, podendo, então, estar associado com resistência à insulina e aterosclerose (BUENO ET AL., 2008). Portanto, os efeitos do óleo de coco ainda são muito controversos e os mecanismos destes efeitos ainda não estão bem esclarecidos na literatura, o que torna a sua prescrição inapropriada.

## Conclusão

Nesse trabalho mostramos que a suplementação materna com óleo de coco no período da lactação programa a prole para hiperfagia, excesso de peso, maior adiposidade central e hiperleptinemia na idade adulta. Essas alterações parecem tornar disfuncional alguns dos mecanismos centrais que controlam a ingestão alimentar, que fogem a via clássica da leptina. A prole programada pelo óleo de coco apresentou maior conteúdo da enzima de síntese de endocanabinóide (DAGL $\alpha$ ) no hipotálamo lateral, que embora sem alteração no receptor CB1 e na enzima de degradação (FAAH), em parte, pode explicar a hiperfagia apresentada por este grupo, pois sugere maior síntese de 2-AG, um conhecido orexigênico.

Entretanto a exposição contínua ao óleo de coco no período pós desmame preveniu a maior parte das disfunções observadas. Surpreendentemente, o grupo OCR, apesar de exibir hipofagia durante o seu desenvolvimento, apresentou maior voracidade quando exposto a uma dieta hiperlipídica. Uma possível explicação para este achado seria o menor conteúdo do receptor de GLP-1 no ARC, uma vez que esse peptídeo inibe a ingestão alimentar de curto prazo.

## REFERÊNCIAS

- AKIEDA-ASAI, S. et al. Role of the neural pathway from hindbrain to hypothalamus in interaction of GLP1 and leptin in rats. *J. Endocrinol.*, v. 220, n. 2, p. 109-116, 2014.
- AL MASSADI, O. et al. Current understanding of the hypothalamic ghrelin pathways inducing appetite and adiposity. *Trends in neurosciences*, mar. 2017.
- ALVES, N. F. B. et al. Acute Treatment with Lauric Acid Reduces Blood Pressure and Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, v. 120, n. 4, p. 348-353, 2017.
- ALVHEIM, A. R. et al. Dietary linoleic acid elevates the endocannabinoids 2-AG and anandamide and promotes weight gain in mice fed a low fat diet. *Lipids*, v. 49, n. 1, p. 59-69, 2014.
- BACH, A. C.; BABAYAN, V. K. Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr.*, v. 36, n. 5, p. 950-962, nov. 1982.
- BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, v. 132, n. 6, p. 2131-2157, 2007.
- BALLAND, E. et al. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell metabolism*, v. 19, n. 2, p. 293-301, fev. 2014.
- BARKER, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. *British Medical Journal*, v. 301, n. 6761, p. 1111, 1990, nov. 1990.
- BARKER, D. J. P. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr.*, v. 23, n. 6, p. 588S-595S, 2004.
- BARRERA, J. G. et al. Hyperphagia and increased fat accumulation in two models of chronic CNS glucagon-like peptide-1 loss of function. *J. Neurosci.*, v. 31, n. 10, p. 3904-3913, mar. 2011.
- BECKER, T. M. et al. Endocannabinoid-dependent disinhibition of orexinergic neurons: Electrophysiological evidence in leptin-knockout obese mice. *Molecular metabolism*, v. 6, n. 6, p. 594-601, 2017.
- BISPO, K. P. et al. Trans and interesterified fat and palm oil during the pregnancy and lactation period inhibit the central anorexigenic action of insulin in adult male rat offspring. *J Physiol Sci.*, v. 65, n. 1, p. 131-138, 2015.
- BJØRBÆK, C. et al. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem.*, v. 274, n. 42, p. 30059-30065, 1999.

BONOMO, I. T. et al. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *J Endocrinol.*, v. 192, n. 2, p. 339-344, 2007.

BOURET, S. G. Nutritional programming of hypothalamic development: critical periods and windows of opportunity. *Int J Obes Suppl.*, v. 2, p. S19-S24, 2012.

BRIGGS, D. I. et al. Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology*, v. 151, n. 10, p. 4745-4755, out. 2010.

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

BURGUERA, B. et al. Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes*, v. 49, n. 7, p. 1219-1223, jul. 2000.

CABRAL, A. et al. Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central ghrelin: critical role of brain accessibility. *J Neuroendocrinol.*, v. 26, n. 8, p. 542-554, jul. 2014.

CABRAL, A. et al. Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System?. *Int J Mol Sci.*, v. 18, n. 3, p. 638, mar. 2017.

CAMPBELL, M. K. Biological, environmental, and social influences on childhood obesity. *Pediatr Res.*, v. 79, n.1, p. 205-211, jan. 2015.

CARDINAL, P. et al. Hypothalamic CB1 cannabinoid receptors regulate energy balance in mice. *Endocrinology*, v. 153, n. 9, p. 4136-4143, set. 2012.

CARDINAL, P. et al. CB 1 cannabinoid receptor in SF1-expressing neurons of the ventromedial hypothalamus determines metabolic responses to diet and leptin. *Molecular metabolism*, v. 3, n. 7, p. 705-716, 2014.

CARDOSO, D. A. et al. A coconut extra virgin oil-rich diet increases HDL cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients. *Nutr Hosp.*, v. 32, n. 5, p. 2144-2152, 2015.

CHAMP, M.; HOEBLER, C. Functional food for pregnant, lactating women and in perinatal nutrition: a role for dietary fibres? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 12, n. 6, p. 565-574, 2009.

CONCEIÇÃO, E. P. S. et al. Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. *Horm Metab Res.*, v. 43, n. 7, p. 513-516, 2011.

CREWS, F.; HE, J.; HODGE, C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 86, n. 2, p. 189-199, 2007.

CRISTINO, L. et al. Obesity-driven synaptic remodeling affects endocannabinoid control of orexinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 110, n. 24, p. E2229-E2238, abr. 2013.

CRISTINO, L.; PALOMBA, L.; DI MARZO, V. New horizons on the role of cannabinoid CB1 receptors in palatable food intake, obesity and related dysmetabolism. *Int J Obes Suppl.*, v. 4, p. S26-S30, 2014.

DATE, Y. et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, v. 123, n. 4, p. 1120-1128, 2002.

DAVIS, J. F. et al. Leptin regulates energy balance and motivation through action at distinct neural circuits. *Biol. Psychiatry*, v. 69, n. 7, p. 668-674, 2011.

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

DELPORTE, C. Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica*, v. 2013, 2013.

DEOL, P. et al. Soybean oil is more obesogenic and diabetogenic than coconut oil and fructose in mouse: potential role for the liver. *PloS one*, v. 10, n. 7, p. e0132672, jul. 2015.

DEVANE, W. A.; AXELROD, J. Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous ligand for the cannabinoid receptor, by brain membranes. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 91, n. 14, p. 6698-6701, jul. 1994.

DHOPESHWARKAR, A.; MACKIE, K. CB2 Cannabinoid receptors as a therapeutic target—what does the future hold?. *Mol Pharmacol.*, v. 86, n. 4, p. 430-437, out. 2014.

DI MARZO, V. et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, v. 410, n. 6830, p. 822-825, abr. 2001.

DI MARZO, V.; LIGRESTI, A.; CRISTINO, L. The endocannabinoid system as a link between homeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation. *Int J Obes.*, v. 33, p. S18-S24, 2009.

DUNSTAN, J. A. et al. The effects of fish oil supplementation in pregnancy on breast milk fatty acid composition over the course of lactation: a randomized controlled trial. *Pediatr Res.*, v. 62, n. 6, p. 689-694, 2007.

EYRES, L. et al. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutrition reviews*, p.267-280, v. 74, n.4, 2016.

FERREIRA, L. et al. Influence of medium- chain triglycerides on consumption and weight gain in rats: a systematic review. *J Anim Physiol Anim Nutr.* , v. 98, n. 1, p. 1-8, 2014.

- FIGLEWICZ, D. P. et al. Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain research*, v. 964, n. 1, p. 107-115, 2003.
- FRANCISCHETTI, E. A.; ABREU, V. G. O sistema endocanabinóide: nova perspectiva no controle de fatores de risco cardiometabólico. *Arq Bras Cardiol.*, v. 87, p. 548-558, 2006.
- FURUHJELM, C. et al. Fish oil supplementation in pregnancy and lactation may decrease the risk of infant allergy. *Acta Paediatr.*, v. 98, n. 9, p. 1461-1467, 2009.
- GEURTS, L. et al. Adipose tissue NAPE-PLD controls fat mass development by altering the browning process and gut microbiota. *Nat Commun.*, v. 6, mar. 2015.
- GUARDA, D. S. et al. Flaxseed oil during lactation changes milk and body composition in male and female suckling pups rats. *Food Chem Toxicol*, v. 69, p. 69-75, 2014.
- GUARDA, D. S. et al. Maternal flaxseed oil intake during lactation changes body fat, inflammatory markers and glucose homeostasis in the adult progeny: role of gender dimorphism. *J Nutr Biochem.*, v. 35, p. 74-80, 2016.
- GUNASEKARAN, R. et al. Maternal intake of dietary virgin coconut oil modifies essential fatty acids and causes low body weight and spiky fur in mice. *BMC Complement Altern Med.*, v. 17, n. 1, p. 79, 2017.
- HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Int J Epidemiol.*, v. 42, n. 5, p. 1215-1222, 2013.
- HANSON, M. A.; GLUCKMAN, P. D. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology?. *Physiological reviews*, v. 94, n. 4, p. 1027-1076, out. 2014.
- HERKENHAM, M. et al. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.*, v. 11, n. 2, p. 563-583, fev. 1991.
- HEYMSFIELD, S. B.; WADDEN, T. A. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. *N Engl J Med.*, v. 376, n. 3, p. 254-266, jan. 2017.
- HIGUCHI, S. et al. Increment of hypothalamic 2-arachidonoylglycerol induces the preference for a high-fat diet via activation of cannabinoid 1 receptors. *Behav Brain Res.*, v. 216, n. 1, p. 477-480, 2011.
- HIGUCHI, S. et al. Hypothalamic 2-arachidonoylglycerol regulates multistage process of high-fat diet preferences. *PloS one*, v. 7, n. 6, p. e38609, jun. 2012.
- HOWLETT, A. C. Cannabinoid receptor signaling. In: *Cannabinoids*. Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 53-79.

- HURLEY, S. W.; JOHNSON, A. K. The role of the lateral hypothalamus and orexin in ingestive behavior: a model for the translation of past experience and sensed deficits into motivated behaviors. *Front Syst Neurosci.*, v. 8, nov. 2014.
- IRVING, A. J.; MCDONALD, N. A.; HARKANY, T. CB1 cannabinoid receptors: molecular biology, second messenger coupling and polarized trafficking in neurons. In: *Cannabinoids and the Brain*. Springer US, 2008. p. 59-73.
- JO, Y-H. et al. Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron*, v. 48, n. 6, p. 1055-1066, dez. 2005.
- JORNAYVAZ, F. R. et al. Low birth weight leads to obesity, diabetes and increased leptin levels in adults: the CoLaus study. *Cardiovasc Diabetol.*, v. 15, n. 1, p. 73, 2016.
- JUNG, C. H.; KIM, M. S. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch. Pharm. Res.*, v. 36, n. 2, p. 201-207, 2013.
- KAJANTIE, E.; OSMOND, C.; ERIKSSON, J. G. Gestational hypertension is associated with increased risk of type 2 diabetes in adult offspring: the Helsinki Birth Cohort Study. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 216, n. 3, p. 281.e1 - e7, mar. 2017.
- KATSURADA, K.; YADA, T. Neural effects of gut- and brain- derived glucagon- like peptide- 1 and its receptor agonist. *J Diabetes Investig.*, v. 7, n. S1, p. 64-69, abr. 2016.
- KIRK, S. L. et al. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS one*, v. 4, n. 6, p. e5870, jun. 2009.
- KIRKHAM, T. C. Cannabinoids and appetite: food craving and food pleasure. *Int Rev Psychiatry*, v. 21, n. 2, p. 163-171, abr. 2009.
- KUMAR, S. N. Variability in coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm and hybrids for fatty acid profile of oil. *J Agric Food Chem.*, v. 59, n. 24, p. 13050-13058, 2011.
- KWOK, K. H. M.; LAM, K. S. L.; XU, A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med.*, v. 48, n. 3, p. 1-12, 2016.
- KWON, O.; KIM, K. W.; KIM, M.S. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cell Mol Life Sci.*, v. 73, n. 7, p. 1457-1477, 2016.
- LAVIANO, A. et al. The growth hormone secretagogue receptor (Ghs-R). *Curr Pharm Des*, v. 18, n. 31, p. 4749-4754, 2012.
- LEMARIÉ, F. et al. Dietary caprylic acid (c8: 0) does not increase plasma acylated ghrelin but decreases plasma unacylated ghrelin in the rat. *PLoS one*, v. 10, n. 7, p. e0133600, jul. 2015.

- LIMA, N. d. S. et al. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. *Br J Nutr.*, v. 105, n. 9, p. 1405-1413, 2011.
- LIMA, N. S. et al. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res.*, v. 45, n. 1, p. 22-30, 2013.
- LISBOA, P. C. et al. Effects of cigarette smoke exposure during suckling on food intake, fat mass, hormones, and biochemical profile of young and adult female rats. *Endocrine*, p. 1-12, maio 2017.
- LOCKYER, S.; STANNER, S. Coconut oil—a nutty idea?. *Nutrition Bulletin*, v. 41, n. 1, p. 42-54, 2016.
- MACKAY, H.; PATTERSON, Z. R.; ABIZAID, A. Perinatal Exposure to Low-Dose Bisphenol-A Disrupts the Structural and Functional Development of the Hypothalamic Feeding Circuitry. *Endocrinology*, v. 158, n. 4, p. 768-777, abr. 2017.
- MARIĆ, G. et al. The role of gut hormones in appetite regulation (review). *Acta Physiol Hung*, v. 101, n. 4, p. 395-407, 2014.
- MARINA, A. M. et al. Chemical properties of virgin coconut oil. *J Am Oil Chem Soc.*, v. 86, n. 4, p. 301-307, 2009.
- MARTIN, J. M. et al. Maternal Diet Supplementation with n-6/n-3 Essential Fatty Acids in a 1.2:1.0 Ratio Attenuates Metabolic Dysfunction in MSG-Induced Obese Mice. *Int J Endocrinol*, v. 2016, 2016.
- MARTIN, T. L. et al. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem.*, v. 281, n. 28, p. 18933-18941, jul. 2006.
- MASON, B. L.; WANG, Q.; ZIGMAN, J. M. The central nervous system sites mediating the orexigenic actions of ghrelin. *Annu Rev Physiol.*, v. 76, p. 519-533, 2014.
- MATTACE RASO, G. et al. Palmitoylethanolamide prevents metabolic alterations and restores leptin sensitivity in ovariectomized rats. *Endocrinology*, v. 155, n. 4, p. 1291-1301, abr. 2014.
- MAZURIER, E. et al. Effects of Maternal Supplementation With Omega-3 Precursors on Human Milk Composition. *J Hum Lact.*, v. 33, n. 2, p. 319-328, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. *Vigitel Brasil 2014 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília : Ministério da Saúde, 2015.*
- MONTGOMERY, M. K. et al. Contrasting metabolic effects of medium-versus long-chain fatty acids in skeletal muscle. *J Lipid Res.*, v. 54, n. 12, p. 3322-3333, set. 2013.

- MORTON, G. J.; MEEK, T. H.; SCHWARTZ, M. W. Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci.*, v. 15, n. 6, p. 367-378, 2014.
- MOURA, E. G. et al. Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. *J Physiol.*, v. 587, n. 20, p. 4919-4929, 2009.
- MOUSAVI, S. N. et al. Effects of Maternal Isocaloric Diet Containing Different Amounts of Soy Oil and Extra Virgin Olive Oil on Weight, Serum Glucose, and Lipid Profile of Female Mice Offspring. *Iran J Med Sci.*, v. 42, n. 2, p. 161, mar. 2017.
- MÜNZBERG, H.; MORRISON, C. D. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism*, v. 64, n. 1, p. 13-23, 2015.
- MYERS, M. G., Jr. et al. The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC. *Cell metabolism*, v. 9, n. 2, p. 117-123, fev. 2009.
- NANDAKUMARAN, M. et al. Influence of coconut oil administration on some hematologic and metabolic parameters in pregnant rats. *J Matern Fetal Neonatal Med.*, v. 24, n. 10, p. 1254-1258, 2011.
- NAUGHTON, S. S. et al. Fatty acid modulation of the endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism. *Int J Endocrinol.*, v. 2013, 2013.
- OBEN, J. A. et al. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *J Hepatol.*, v. 52, n. 6, p. 913-920, 2010.
- PARK, H. K.; AHIMA, R. S. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism*, v. 64, n. 1, p. 24-34, 2015.
- PASSOS, M. C. F. et al. Feeding behavior of adult rats submitted to protein malnutrition whose mothers received protein restricted diets during lactation. *Rev. Nutr.*, v. 14, p. 7-11, 2001.
- PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. *J Nutr.*, v. 140, n. 3, p. 658-661, 2010.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4. ed. Academic Press, 1998.
- PEREZ-TILVE, D. et al. Ghrelin-induced adiposity is independent of orexigenic effects. *FASEB J*, v. 25, n. 8, p. 2814-2822, aug. 2011.
- PINHEIRO, C. R. et al. Maternal nicotine exposure during lactation alters food preference, anxiety-like behavior and the brain dopaminergic reward system in the adult rat offspring. *Physiol Behav.*, v. 149, p. 131-141, 2015a.

- PINHEIRO, C. R. et al. Concurrent maternal and pup postnatal tobacco smoke exposure in Wistar rats changes food preference and dopaminergic reward system parameters in the adult male offspring. *Neuroscience*, v. 301, p. 178-192, 2015b.
- PLAGEMANN, A. et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, v. 99, n. 3, p. 154-158, 1992.
- PRINZ, P.; STENGEL, A. Control of Food Intake by Gastrointestinal Peptides: Mechanisms of Action and Possible Modulation in the Treatment of Obesity. *J Neurogastroenterol Motil*, v. 23, n. 2, p. 180, abr. 2017.
- QASEM, R. J. et al. Maternal protein restriction during pregnancy and lactation alters central leptin signalling, increases food intake, and decreases bone mass in 1 year old rat offspring. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, v. 43, n. 4, p. 494-502, 2016.
- QUITETE, F. T. *Influência da suplementação materna com diferentes tipos de óleos no período de lactação sobre parâmetros endócrino-metabólicos das proles em curto e longo prazos*. 2016. 89f. Qualificação (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- REEVES, P. G.; NIELSEN F. H.; FAHEY, G. C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.*, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.
- REMMERS, F.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocrine reviews*, v. 32, n. 2, p. 272-311, nov. 2010.
- RIZZO, G. et al. Coconut and sunflower oil ratios in ice cream influence subsequent food selection and intake. *Physiology & behavior*, v. 164, p. 40-46, 2016.
- RODRIGUES, A. L. et al. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem.*, v. 22, n. 2, p. 109-117, 2011.
- RONVEAUX, C. C.; TOMÉ, D.; RAYBOULD, H. E. Glucagon-like peptide 1 interacts with ghrelin and leptin to regulate glucose metabolism and food intake through vagal afferent neuron signaling. *J Nutr.*, v. 145, n. 4, p. 672-680, 2015.
- RYTTER, D. et al. Intake of fish oil during pregnancy and adiposity in 19-y-old offspring: follow-up on a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.*, v. 94, n. 3, p. 701-708, jul. 2011.
- SÁNCHEZ, J. et al. Maternal supplementation with an excess of different fat sources during pregnancy and lactation differentially affects feeding behavior in offspring: putative role of the leptin system. *Mol Nutr Food Res.*, v. 56, n. 11, p. 1715-1728, 2012.
- SANTOS-SILVA, A P. et al. Endocrine effects of tobacco smoke exposure during lactation in weaned and adult male offspring. *J. Endocrinol.*, v. 218, n. 1, p. 13-24, 2013.

SCHELLEKENS, H.; DINAN, T. G.; CRYAN, J.F. Lean mean fat reducing “ghrelin” machine: hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *Neuropharmacology*, v. 58, n. 1, p. 2-16, 2010.

SHIMIZU, Y. et al. Role of leptin in conditioned place preference to high-fat diet in leptin-deficient ob/ob mice. *Neurosci Lett*, v. 640, p. 60-63, 2017.

SHIRAZI, F. et al. Diet modification and metformin have a beneficial effect in a fly model of obesity and mucormycosis. *PloS one*, v. 9, n. 9, p. e108635, set. 2014.

SHUTO, Y. et al. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest.*, v. 109, n. 11, p. 1429-1436, jun. 2002.

SIMPSON, K. A.; MARTIN, N. M.; BLOOM, S. R. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, v. 53, n. 2, p. 120-128, 2009.

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

SUTTON, A. K.; MYERS, M. G., Jr; OLSON, D. P. The role of PVH circuits in leptin action and energy balance. *Annu Rev Physiol.*, v. 78, p. 207-221, 2016.

TOSTE, F. P. et al. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rat. *Br J Nutr.*, v. 95, n. 04, p. 830-837, 2006.

TREVENZOLI, I.H. et al. Neonatal hyperleptinemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J Physiol.*, v.580, p.629-637, 2007.

TSCHÖP, M. et al. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, v. 50, n. 4, p. 707-709, abr. 2001.

URWIN, H. J. et al. Salmon consumption during pregnancy alters fatty acid composition and secretory IgA concentration in human breast milk. *J. Nutr.*, v. 142, n. 8, p. 1603-1610, jun. 2012.

VETTOR, R.; PAGANO, C. The role of the endocannabinoid system in lipogenesis and fatty acid metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, v. 23, n. 1, p. 51-63, 2009.

VICTORA, C. G. et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *The Lancet*, v. 387, n. 10017, p. 475-490, 2016.

WARSTEDT, K. et al. High levels of omega- 3 fatty acids in milk from omega- 3 fatty acid- supplemented mothers are related to less immunoglobulin E- associated disease in infancy. *Acta Paediatr.*, v. 105, n. 11, p. 1337-1347, 2016.

WATKINS, B. A.; KIM, J. The endocannabinoid system: directing eating behavior and macronutrient metabolism. *Front Psychol.*, v. 5, jan. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight. Media Centre, fact sheet N°311, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: fev. 2017.

YOUNES-RAPOZO, V. et al. Early weaning is associated with higher neuropeptide Y (NPY) and lower cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in the paraventricular nucleus (PVN) in adulthood. *Br J Nutr.*, v. 108, n. 12, p. 2286-2295, 2012.

YOUNES-RAPOZO, V. et al. Maternal nicotine exposure during lactation alters hypothalamic neuropeptides expression in the adult rat progeny. *Food Chem Toxicol.*, v. 58, p. 158-168, 2013.