

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**MODELO EXPERIMENTAL DE RESTRIÇÃO DE
CRESCIMENTO INTRAUTERINO EM RATAS
WISTAR E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE AS
CONCENTRAÇÕES PERIFÉRICAS DE LEPTINA
NAS MÃES E NOS FILHOTES**

TESE DE DOUTORADO

THIAGO BELTRAM MARCELINO

Porto Alegre, Brasil
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**MODELO EXPERIMENTAL DE RESTRIÇÃO DE
CRESCIMENTO INTRAUTERINO EM RATAS
WISTAR E SUAS REPERCUSSÕES SOBRE AS
CONCENTRAÇÕES PERIFÉRICAS DE LEPTINA
NAS MÃES E NOS FILHOTES**

Aluno: Thiago Beltram Marcelino

Orientador: prof. Dr. Marcelo Zubaran Goldani

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, Brasil
2020

CIP - Catalogação na Publicação

Marcelino, Thiago

Modelo experimental de restrição de crescimento intrauterino em ratas wistar e suas repercussões sobre as concentrações periféricas de leptina nas mães e nos filhotes / Thiago Marcelino. -- 2020.

69 f.

Orientador: Marcelo Goldani.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Restrição de crescimento intrauterino. 2. Leptina. 3. Receptor de leptina. 4. Leite materno. I. Goldani, Marcelo, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

21 / 12 / 2020

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof.^a. Dr.^a. Elsa Regina Justo Giugliani
Departamento de Pediatria/ PPGSCA
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Lucas Kich Grun
Escola de Medicina
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Luciano Sturmer de Fraga
Departamento de Fisiologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese a todos os pesquisadores que trabalham diariamente para produção de material científico. É um meio muito importante e tão pouco valorizado no país, principalmente nos últimos dois anos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a todos os meus colegas de graduação e mestrado, que me ajudaram a dar meus primeiros passos nessa trajetória científica e principalmente me proporcionaram momentos únicos de bebedeiras e amizades que levarei para o resto da minha vida. Agradeço a minha família pelo suporte emocional e financeiro durante toda a vida, sendo fundamentais para a minha atual independência e formação pessoal.

Agradeço em especial a todo o grupo NESCA por ter me acolhido em um momento de incerteza acadêmica. Foi um convite iniciado pela profa. Juliana e estendido pelo resto dos alunos e professores. Faço um agradecimento especial ao professor Marcelo Z. Goldani por ter me aceitado como aluno e por ter sido meu mentor científico nesses quatro anos de doutorado. Sou grato pela ajuda e suporte de todos os alunos de graduação e pós graduação do grupo, principalmente a Isabel Werlang por ter me coorientado nos momentos iniciais do projeto e Andressa Wiltgen, Bianca Cazarotto, Diego Almeida, Franciele Martins, por terem compartilhados momentos divertidos e especiais durante os dias de experimentos no laboratório.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal por serem fundamentais para a realização de todo o meu projeto. Todos tiveram uma contribuição extremamente significativa para que os dados fossem coletados de maneira segura tanto para o pesquisador quanto para os animais. Agradeço especialmente a coordenadora Marta Justina Giotti Cioato pela disponibilidade em resolver todos os problemas experimentais que ocorreram durante o doutorado.

Finalmente, gostaria de agradecer aos órgãos financiadores do projeto, principalmente ao FINE do HCPA por financiar grande parte do projeto e CAPES pela minha bolsa de

doutorado e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo excelente ensino que me proporcionou, tanto na graduação quanto na pós.

EPÍGRAFE

Si os dan papel pautado, escribid por el outro lado.

- Juan Ramón Jiménez -

RESUMO

Introdução: Apesar de oferecer um ambiente ideal para que ocorra o desenvolvimento fetal, o meio intrauterino pode estar vulnerável a fatores externos como alterações maternas, placentárias ou fetais. Como consequência, ocorre o comprometimento do crescimento embrionário sistêmico, levando a desfechos manifestados no recém-nascido. O baixo peso ao nascer representa uma porcentagem alta de neonatos, sendo a restrição de crescimento intrauterino a principal responsável por esse evento. Quando o recém-nascido tem seu peso abaixo do 10º percentil da curva de crescimento infantil, ele é classificado como pequeno para a idade gestacional. Esse grupo desenvolve um *catch up* precoce como característica de compensação fisiológica, além de apresentar baixa concentração de leptina no leite de suas progenitoras. Esse hormônio desempenha diversas funções biológicas, com o destaque para a regulação na resposta de saciedade através de sua ligação em receptores no hipotálamo, alterando diretamente a homeostase energética. Existem diferentes modelos animais para o estudo da restrição de crescimento intrauterino, porém pouco se sabe sobre as alterações metabólicas do *catch up* precoce e da contribuição da baixa concentração de leptina no leite materno para esse fenômeno. **Objetivo:** Com isso, o objetivo desse trabalho é avaliar o melhor modelo animal indutor de restrição de crescimento intrauterino através de diferentes dietas gestacionais e avaliar o perfil da leptina nas mães e nos filhotes. **Metodologia:** Para isso fêmeas *Wistar* foram acasaladas e quando confirmada a prenhez divididas em 4 grupos dietéticos: controle (348,5Kcal/100g), hipoproteica (isocalórica, 8% de proteína), hiperlipídica (459Kcal/100g) e restrição alimentar (restrição de 30% do consumo). A dieta permaneceu até o final da gestação. O peso corporal foi aferido nos dias 0, 7, 14 e 21. Os filhotes foram pesados e medidos o seu comprimento no dia do nascimento e parte da ninhada foi eutanasiada para dissecação do hipotálamo e coleta do sangue. O restante dos animais permaneceu com suas respectivas mães até o segundo dia de vida, quando foi realizado o procedimento de coleta de leite materno. Após esse processo elas foram eutanasiadas, dissecado o hipotálamo e coletada a gordura corporal total. **Resultados:** O consumo alimentar ocorreu dentro do esperado, sem a sobreposição do efeito da redução proteica no grupo com restrição alimentar. A dieta de restrição alimentar apresentou peso menor que o controle nos dias 7, 14 e 21, e quanto as demais dietas apenas no dia 21. O grupo de restrição alimentar apresentou menor peso de tecido adiposo branco que o controle. Esse grupo também apresentou uma menor concentração de leptina no leite e juntamente com a dieta hipoproteica, apresentou um aumento na expressão dos seus receptores no hipotálamo. Essa dieta induziu um menor peso e comprimento nos filhotes, sendo

uma tendência a redução nos demais grupos. A leptina do sangue dos filhotes foi reduzida em todos os grupos dietéticos, quando comparados com o controle. A dieta hipoproteica apresentou uma redução na expressão dos receptores de leptina apenas nos filhotes machos. Os demais resultados não apresentaram diferenças entre machos e fêmeas. **Conclusão:** A dieta de restrição alimentar moderada durante a gestação se mostrou o melhor modelo para estudos translacionais relacionados aos fenômenos em filhotes pequenos para a idade gestacional.

ABSTRACT

Introduction: Despite offering an ideal environment for fetal development to occur, the intrauterine environment may be vulnerable to external factors such as maternal, placental or fetal changes. As a consequence, systemic embryonic growth is compromised, leading to outcomes manifested in the newborn. Low birth weight represents a very significant percentage of neonates, with intrauterine growth restriction being the main responsible for this event. When the newborn's weight is below the 10th percentile of the infant growth curve, it is classified as small for gestational age. This group develops an early catch up as a characteristic of physiological compensation, in addition to having low leptin concentration in the milk of their mothers. This hormone performs several biological functions, with emphasis on its role in regulating the satiety response through its binding to receptors in the hypothalamus, directly altering energy homeostasis. There are different animal models for the study of intrauterine growth restriction, but little is known about the metabolic changes of early catch up and the contribution of low leptin concentration in breast milk to this phenomenon. **Aim:** Thus, the aim of this study is to evaluate the best animal model to induce intrauterine growth restriction through different gestational diets and to measure the leptin profile in mothers and offspring.

Methodology: For this, Wistar females were mated and when pregnancy was confirmed divided into 4 dietary groups: control (348.5Kcal/100g), low protein (isocaloric, 8% protein), high fat (459Kcal/100g) and food restriction (30% of consumption restriction). The diet remained until the end of pregnancy. Body weight was measured on days 0, 7, 14 and 21. The offspring were weighed and their length was measured on the day of birth and part of the litter was euthanized for dissection of the hypothalamus and blood collection. The rest of the animals remained with their respective mothers until the second day of life, when the breast milk collection procedure was performed. After this process they were euthanized, the hypothalamus was dissected and the total body fat was collected. **Results:** Food consumption occurred as expected, without overlapping the effect of protein reduction in the group with food restriction. The food restriction diet had a lower weight than the control on days 7, 14 and 21, and the other diets only on day 21. The food restriction group had lower weight of white adipose tissue than the control. This group also had a lower concentration of leptin in the milk and, together with the hypoprotein diet, showed an increase in the expression of its receptors in the hypothalamus. This diet induced less weight and length in the pups, with a tendency to decrease in the other groups. Offspring leptin blood was reduced in all dietary groups when compared to control. The hypoprotein diet showed a reduction in leptin receptor expression only in male pups. The other

results showed no differences between males and females. **Conclusion:** The moderate food restriction diet during pregnancy proved to be the best model for translational studies related to the phenomena in small for gestational age offspring who suffered early catch up.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Avaliação do escore Z de peso e altura ajustados pela idade, em crianças pequenas para a idade gestacional e no grupo controle do projeto IVAPSA em 5 momentos do período gestacional	21
Figura 2 – Modelo esquemático da atuação da leptina no sistema nervoso central	22
Figura 3 – Desenho experimental do modelo animal de ratos <i>Wistar</i> para a indução de restrição de crescimento intrauterino com diferentes perfis dietéticos	30
Figura 4 – Comparação dos diferentes perfis dietéticos em relação ao peso corporal durante a gestação e do tecido adiposo branco das ratas gestantes	36
Figura 5 – Concentração de leptina no leite materno	37
Figura 6 – Análise da expressão de leptina na gordura e dos receptores das ratas gestantes nos diferentes perfis dietéticos	38
Figura 7 – Peso e comprimento dos filhotes machos e fêmeas no dia pós-natal zero nos diferentes perfis dietéticos das mães durante a gestação	41
Figura 8 – Dosagem de glicose dos filhotes no dia zero pós-natal	42
Figura 9 – Concentração de leptina no sangue dos filhotes machos e fêmeas no dia pós-natal zero	43
Figura 10 – Análise da expressão dos receptores de leptina nos filhotes machos e fêmeas cujas mães realizaram os diferentes perfis dietéticos durante a gestação	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Consumo total, energético e proteico das mães que realizaram diferentes perfis dietéticos durante a gestação	35
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIG	Adequado para a idade gestacional
AM	Aleitamento materno
ARC	Núcleo arqueado
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CTL	Controle
DG	Dia gestacional
DMH	Hipotálamo dorsomedial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNP	Dia pós-natal
DOHaD	Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença
HCPA	Hospital de Clinicas de Porto Alegre
HL	Hiperlipídica
HP	Hipoproteica
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
LM	Leite materno
OMS	Organização Mundial da Saúde
PIG	Pequenos para a idade gestacional
PMV	Núcleo ventral pré-mamilar
PVN	Núcleo paraventricular

RA	Restrição alimentar
RCIU	Restrição de crescimento intrauterino
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema nervoso central
UEA	Unidade de Experimentação Animal
VMH	Hipotálamo ventromedial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	AMBIENTE INTRAUTERINO	20
2.2	ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DA DOENÇA	20
2.3	RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO	21
2.4	LEITE MATERNO	23
2.5	LEPTINA E SEU RECEPTOR	25
2.6	MODELO ANIMAL DE RCIU	27
3	JUSTIFICATIVA	29
4	OBJETIVOS	30
4.1	OBJETIVO GERAL	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5	HIPÓTESES	31
6	METODOLOGIA	32
6.1	MODELO ANIMAL	32
6.2	GRUPOS DIETÉTICOS	32
6.3	DESENHO EXPERIMENTAL	33
6.4	COLETA DE LEITE	35
6.5	DOSAGEM DE LEPTINA NO LEITE E SANGUE	35
6.6	EXPRESSÃO GÊNICA DE LEPTINA E SEUS RECEPTORES	35
6.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
7	RESULTADOS	36
7.1	DADOS MATERNOS	36
7.1.1.	Consumo alimentar	36
7.1.2.	Peso corporal e do tecido adiposo branco	37
7.1.3.	Leptina no leite	37
7.1.4.	Expressão de leptina e seus receptores	37
7.2	DADOS DOS FILHOTES	42
7.2.1.	Peso e comprimento	42
7.2.2.	Glicemia do sangue no dia do nascimento	42
7.2.3.	Concentração de leptina do sangue no dia do nascimento	42
7.2.4.	Receptores de leptina	42
8	DISCUSSÃO	48
9	CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	57

REFERÊNCIAS	58
ANEXO A - ARTIGO 1	Erro! Indicador não definido.
ANEXO B - ARTIGO 2	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

O ambiente intrauterino é extremamente importante para o desenvolvimento embrionário e fetal, uma vez que proporciona as condições fisiológicas necessárias para que seu crescimento ocorra de maneira adequada (SEDAGHAT *et al.*, 2015). Durante o período gestacional, este meio está suscetível a fatores externos relacionados à mãe como estresse (RASHID *et al.*, 2020), baixa ingestão nutricional (GETE *et al.*, 2020), ganho de peso (HINKLE *et al.*, 2015), modificações epigenéticas e alterações na programação metabólica intrauterina (LESSEUR; CHEN, 2018; GOYAL *et al.*, 2019), comprometendo o crescimento sistêmico do feto.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que o baixo peso ao nascer (< 2.500 g) corresponde a uma prevalência de 20% de todos os partos no mundo, sendo esta a causa da morte de aproximadamente 80% dos recém-nascidos (WHO, 2019). Quando o neonato apresenta um peso inferior ao percentil 10 da curva de peso ao nascimento pela idade gestacional, é classificado como pequeno para a idade gestacional (PIG) (LEE *et al.*, 2013), com a prevalência de uma a cada cinco crianças com o nascimento dentro do período gestacional adequado (BLACK, 2015; LEE *et al.*, 2017). Este fenômeno pode ocorrer devido à restrição de crescimento que ocorre dentro do útero, como consequência tanto de fatores maternos, fetais, como fatores genéticos e placentários (SHARMA *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2018; EATON *et al.*, 2020).

Uma das principais programações metabólicas sofridas por recém-nascidos PIG é o crescimento antropométrico em um curto período de tempo, se equiparando aos mesmos parâmetros de crianças adequadas para a idade gestacional (AIG) (PEPE *et al.*, 2020). Este efeito denomina-se *catch up* e, quando ocorre de maneira precoce, pode proporcionar a manifestação de doenças na fase adulta (MERICQ *et al.*, 2005). Esse mesmo fenômeno é

encontrado em recém-nascidos FIG, juntamente com baixa concentração de leptina no leite maduro (NUNES *et al.*, 2017).

O hormônio leptina é produzido nos adipócitos e atua em células neuronais do hipotálamo no sistema nervoso central (SNC). A sua concentração é, portanto, proporcionalmente influenciada pela quantidade de tecido adiposo (SAVINO *et al.*, 2013). Além disso, pode ser encontrada na placenta, no cordão umbilical e em células mamárias (WEYERMANN *et al.*, 2006; DÜNDAR *et al.*, 2010). Estudos em humanos demonstraram que quantidades insuficientes de leptina durante o período da lactação induzem menor proteção contra a obesidade e desordens metabólicas quando essas crianças atingem a fase adulta (DONERAY *et al.*, 2009; D'SOUZA *et al.*, 2014), mas ainda não se sabem os efeitos desse hormônio na expressão dos receptores e no leite em modelos animais indutores de filhotes FIG.

O leite materno (LM) é a principal fonte de nutrientes do recém-nascido, uma vez que irá suprir as funções placentárias importantes para o seu desenvolvimento. Ele apresenta concentrações adequadas de proteínas, lipídios, carboidratos e diversos componentes biologicamente ativos (WITKOWSKA-ZIMNY; KAMINSKA-EL-HASSAN, 2017). Sua composição pode mudar em resposta a determinados fatores, correspondendo às necessidades do neonato de acordo com suas características (ANDREAS *et al.*, 2015). Além do efeito protetor contra a manifestação de sintomas de obesidade e diabetes na fase adulta dos recém-nascidos, a leptina do leite apresenta uma relação indireta com uma regulação na plasticidade neural hipotalâmica (PICÓ *et al.*, 2007), juntamente com alterações no padrão de metilação do DNA em resposta a alterações nas condições dietéticas durante a sua vida (PALOU *et al.*, 2018).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AMBIENTE INTRAUTERINO

A gestação é um período no qual ocorre o desenvolvimento e amadurecimento fetal, com seu crescimento tecidual e sistêmico ocorrendo de maneira gradual, desde a formação embrionária até o momento do nascimento. Nas primeiras semanas gestacionais ocorre o crescimento embrionário, junto com a implantação e desenvolvimento placentário, que será responsável pela produção hormonal importante para a gestação e nutrição fetal durante todo esse período (KNÖFLER *et al.*, 2019). A partir da terceira semana começa o início da formação dos principais sistemas como do SNC e sistema circulatório, prolongando seu desenvolvimento durante toda segunda metade da gestação (SCHNEIDER *et al.*, 2018). Do segundo trimestre em diante ocorre o crescimento dos demais sistemas biológicos importantes, dando continuidade após o parto, como algumas regiões do encéfalo permanecendo em amadurecimento até o final da adolescência (DAYAN *et al.*, 2010).

O estágio inicial da gravidez, mais especificamente o primeiro trimestre, apresenta um período no qual o feto pode ser extremamente suscetível à influência de fatores de exposição materna, podendo comprometer o desenvolvimento neonatal (POON *et al.*, 2018; PARISI *et al.*, 2019). A partir do segundo e terceiro trimestre da gravidez ocorre um aumento nas conexões cerebrais funcionais, sugerindo a presença de redes motoras e sensoriais primárias, bem como os primeiros sinais de redes de ordem superior de cognição (TURK *et al.*, 2019), salientando a relevância dos estágios de desenvolvimento fetal e sua vulnerabilidade a fatores externos durante essas etapas.

2.2 ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DA DOENÇA

Estudos epidemiológicos evidenciam as relações entre fatores ambientais influenciando alterações metabólicas e epigenéticas do feto, ocasionando a expressão fenotípica de doenças na fase adulta desse indivíduo (GOYAL *et al.*, 2019). Trabalhos voltados para as origens

desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD) contribuem para a investigação de possíveis alterações no crescimento e desenvolvimento infantil (FLEMING *et al.*, 2015). Eles exploram o período gestacional e a ação de variáveis ambientais no qual a mãe está inserida, como fatores sociodemográficos (OLIVEIRA *et al.*, 2016), estresse perinatal (CAO-LEI *et al.*, 2017), status nutricional materno (BJERREGAARD *et al.*, 2019), como responsáveis pela alteração na programação metabólica intrauterina, atuando diretamente em desfechos do recém-nascido. Um dos mecanismos mais relacionados com o *cross-talk* entre o ambiente e as alterações biológicas da criança é a epigenética, através de modulações em nível de metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e histonas, ocasionadas, por exemplo, pela dieta materna durante a gestação (FUKUOKA; KUBOTA, 2018).

Um dos estudos pioneiros desta área foi realizado por Barker e colaboradores (1989), correlacionando o baixo peso ao nascer com doenças cardiovasculares na fase adulta dessas crianças. Adultos nascidos com o peso inferior ao esperado para a idade gestacional, podem apresentar uma maior predisposição a diabetes e obesidade concomitante a maiores níveis de leptina em relação à gordura corporal (JORNAYVAZ *et al.*, 2016). Os modelos animais são de extrema importância para explorando os mecanismos envolvidos nestes achados clínicos. Modelos indutores de baixo peso ao nascer demonstraram uma alteração da fisiologia muscular através da alteração nas funções mitocondriais oxidativas (BEAUCHAMP *et al.*, 2015), alteração na expressão de genes relacionados à adipogênese (ISGANAITIS *et al.*, 2009), podendo contribuir para um aumento da adiposidade na fase adulta desses animais, como observado em humanos.

2.3 RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO

Uma das causadoras do nascimento de crianças com baixo peso é a restrição de crescimento intrauterino (RCIU). Essa comorbidade pode também ser definida como a falha do feto de atingir o seu potencial genético de crescimento, podendo ser devido a fatores maternos,

fetais, placentários ou à nível de DNA (SHARMA *et al.*, 2017). A influência da gestante no desfecho antropométrico e metabólico da criança pode se dar através de uma alteração no *status* dietético (WU *et al.*, 2012), estresse perinatal (AE-NGIBISE *et al.*, 2019), baixo peso pré-gestacional (JAVADI *et al.*, 2019), entre outras características. Apesar dos mecanismos envolvidos nas alterações placentárias ocorridas em mães que sofreram RCIU ainda não estarem bem descritos na literatura, sabe-se que existe uma alteração na angiogênese placentária, levando a uma perfusão uteroplacentária inadequada (BARUT *et al.*, 2010) bem como à alteração da expressão de alguns genes importantes (AWAMLEH *et al.*, 2019).

Entre os nascimentos de um ambiente intrauterino com restrição de crescimento, pode-se destacar os classificados como FIG. Eles apresentam uma prevalência estimada de 27% dos partos ocorridos em países de renda baixa e média (BLACK, 2015). Segundo a OMS, é considerado como pequeno para a idade gestacional o recém-nascido nascido com o peso inferior ao percentil 10 da curva de crescimento infantil, de acordo com a idade gestacional (LEE *et al.*, 2013). Acredita-se que os principais fatores que influenciam este baixo peso ao nascer correspondem a aproximadamente 40% genético e 60% a estímulos ambientais externos ao intraútero (DEVASKAR AND CHU, 2016), como idade materna, distúrbios hipertensivos, diabetes pré-gestacional, entre outros (VAYSSIÈRE *et al.*, 2015). Além do déficit cognitivo, essas crianças podem apresentar riscos de doenças cardiovasculares (FRANCO *et al.*, 2008), aumento na sensibilidade à insulina em relação à glicose sanguínea no início da vida pós-natal (BAZAES *et al.*, 2003), podendo se expressar em doenças na fase adulta.

Uma das principais programações metabólicas sofridas por recém-nascidos FIG é o ganho de peso em um período muito curto, denominado de *catch up*, sendo comum ocorrer nos primeiros 24 meses de vida (MARTIN *et al.*, 2017). Este fenômeno pode ser definido como uma velocidade de crescimento acima dos limites estatísticos de normalidade, baseado na idade ou maturidade do indivíduo, seguido de um período transitório de inibição do crescimento

(WIT; BOERSMA, 2002). Quando este mecanismo de compensação fisiológica ocorre de maneira precoce, a criança pode apresentar alguns distúrbios durante o seu desenvolvimento, transitando até a fase adulta como obesidade (ONG *et al.*, 2000), resistência à leptina e insulina (DULLOO, 2008; MORRISON *et al.*, 2010), problemas cardiovasculares (CHO; SUH, 2016), entre outros sintomas crônicos.

2.4 LEITE MATERNO

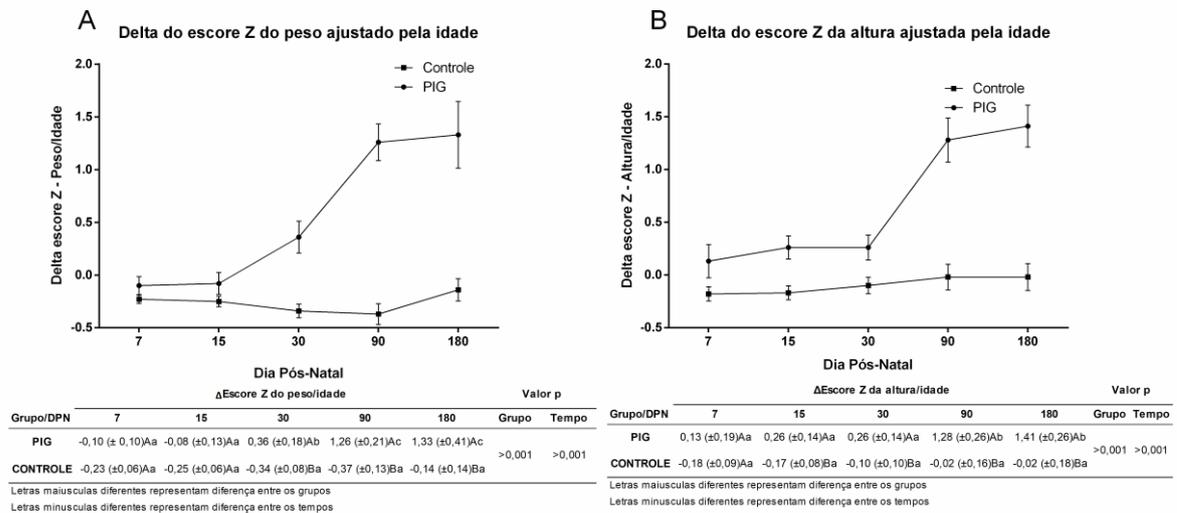
O principal recurso do recém-nascido para o seu crescimento e desenvolvimento no período pós-natal é o leite materno. De acordo com a OMS e o Fundo das Nações Unidas para Infância (UNICEF), o aleitamento materno (AM) deve ocorrer de maneira exclusiva até o sexto mês de vida da criança, e complementando com outros alimentos até os dois anos de idade ou mais (LÓPEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2017). A presença de elementos bioativos contribui para diversas alterações metabólicas importantes como a regulação do balanço energético (GROTE *et al.*, 2016), compensam as deficiências do sistema imune do recém-nascido (PALMEIRA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2016), auxiliando na composição e desenvolvimento corporal do indivíduo.

Alguns trabalhos mostram a importância de macromoléculas como a leptina na prevenção de doenças como obesidade (PALOU *et al.*, 2018), ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa como protetores contra hipertensão, resistência à insulina e riscos de doenças coronarianas (DAS, 2003), entre outros benefícios. Uma maior concentração de proteínas totais no LM após uma dieta rica em proteínas durante a lactação está relacionada com o rápido crescimento pós-natal (LIND *et al.*, 2017), assim como um aumento na diversidade de macronutrientes como oligossacarídeos está relacionado às mesmas alterações do recém-nascido (ALDERETE *et al.*, 2015), podendo levar à obesidade durante o seu desenvolvimento. Esses carboidratos são encontrados em baixa concentração no leite de mães que tiveram

crianças PIG, quando comparadas aos grupos com o peso adequado ou até mesmo grandes para a idade gestacional (Phattraprayoon *et al.*, 2018).

Figura 1- Delta do escore z de peso (A) e altura (B) de crianças pequenas para a idade gestacional (PIG) ajustados pela idade comparadas com o controle, nos dias gestacionais 7, 15, 30, 90 e 180.

Figura adaptada de Nunes *et al.* (2017).



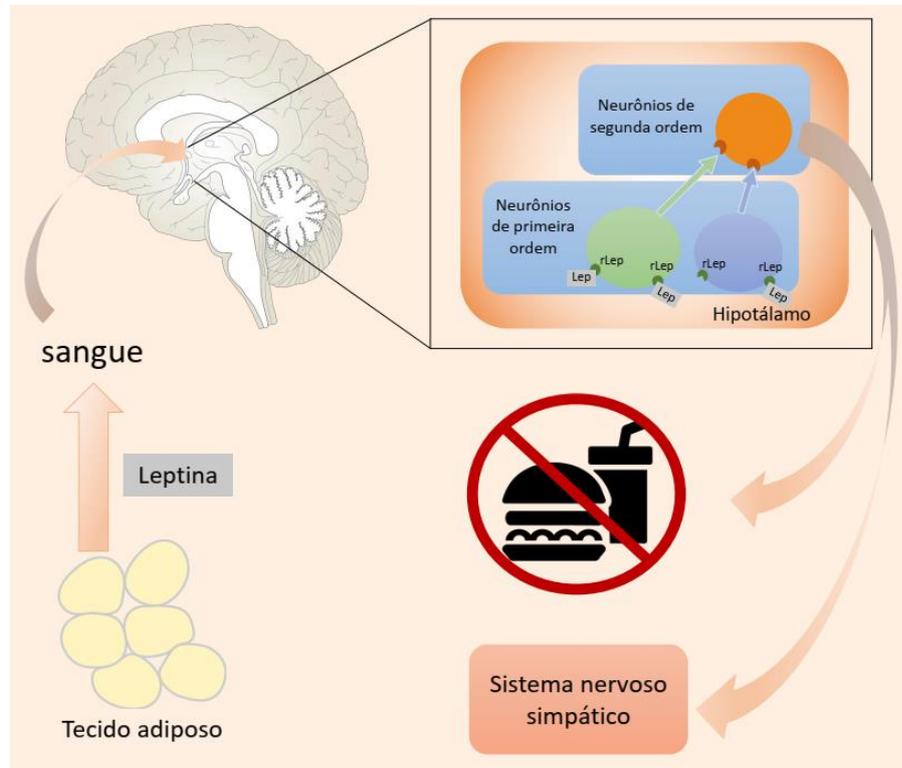
O perfil do LM de genitoras de crianças pequenas para a idade gestacional mostra alteração de alguns componentes, embora ainda não se tenha um perfil completo dessas modificações. O conteúdo total de gordura não tem uma alteração aparente entre esse grupo e o de recém-nascidos com o peso adequado, tanto no colostro quando no leite transição e maduro (DOMANY *et al.*, 2015). As mães de crianças PIG e que apresentaram um quadro de diabetes gestacional, apresentaram uma baixa concentração de proteínas totais, o que juntamente com as concentrações de gordura e de lactose, diminuindo o AM desses neonatos (GEORGE *et al.*, 2019). Recentemente, nosso grupo observou um *catch up* precoce em recém-nascidos PIG, quando comparado ao grupo controle, nos primeiros meses de vida (Figura 1), juntamente com uma menor concentração de leptina no leite maduro (NUNES *et al.*, 2017). Apesar desses achados, ainda não se sabe ao certo quais os principais mecanismos metabólicos envolvidos nesse efeito.

2.5 LEPTINA E SEU RECEPTOR

Um dos hormônios mais importantes para a regulação de saciedade do recém-nascido que está presente no leite materno é a leptina. Ele é uma proteína composta por 167 aminoácidos e tem um peso aproximado de 16kDa. É produzido pelo gene *Lep* localizado no cromossomo 7, contendo 3 exons e 2 íntrons (VAN DER LENDE *et al.*, 2005). Foi descoberto em 1994 após a clonagem e estudo de um gene presente em um modelo de camundongo para obesidade, descrevendo sua homologia em humanos (ZHANG *et al.*, 1994). Sua produção ocorre em grande parte no tecido adiposo branco, sendo produzida também na placenta, cordão umbilical e em células mamárias (WEYERMANN *et al.*, 2006).

Após a sua liberação para a corrente sanguínea, a leptina atravessa a barreira hematoencefálica e interage com seus receptores localizados em neurônios orexígenos e anorexígenos de primeira ordem no hipotálamo. Eles enviam sinais para os neurônios de segunda ordem, os quais enviam uma resposta para outras regiões do encéfalo que produzem o comportamento de saciedade, juntamente com sinais para o sistema nervoso simpático responsáveis pelo gasto energético (TRIANAFYLLOU *et al.*, 2016) (Figura 2). Sua ação endócrina também ocorre através do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), influenciando os níveis dos hormônios tireoidianos, dos hormônios de crescimento, cortisol e esteroides sexuais (MALENDOWICZ *et al.*, 2007). Essas duas ações podem influenciar também alterações na conformação do esqueleto, com ação direta nos osteoblastos, aumentando assim a densidade óssea (REID *et al.*, 2018) e contribuindo para o crescimento do indivíduo.

Figura 2 – Modelo esquemático da atuação da leptina nas distintas regiões do hipotálamo, atuando diretamente na diminuição da ingestão de alimentos e ativação do sistema nervoso simpático



Durante a gravidez, a concentração de leptina no sangue tem se mostrado aumentada, mais especificamente durante o segundo trimestre, mantendo um nível estável no terceiro, diminuindo drasticamente os níveis após o parto (BRIFFA *et al.*, 2015). Esse hormônio parece ter um papel importante na implantação embrionária, uma vez que o endométrio e o embrião expressam receptores de leptina (SCHANTON *et al.*, 2018). A produção de leptina pela placenta auxilia na regulação imunológica durante o processo de crescimento embrionário, com a expressão de citocinas e outros genes relacionados à resposta inflamatória (LAPPAS *et al.*, 2005). Existe um possível papel da leptina no desenvolvimento intrauterino fetal, uma vez que trabalhos com neonatos provenientes de uma restrição de crescimento intrauterino apresentaram menor concentração dessa proteína no sangue (CATOV *et al.*, 2007), apresentando um aumento durante a infância até a fase adulta deste indivíduo (PÉREZ-PÉREZ *et al.*, 2018).

2.6 MODELO ANIMAL DE RCIU

Existem diferentes modelos animais que exploram os mecanismos relacionados à RCIU. Os dois principais que buscam mimetizar os efeitos encontrados na pesquisa clínica são: 1) ligação da artéria uterina e 2) alteração dietética durante a gestação (DEVASKAR; CHU, 2016). Graças a esses delineamentos experimentais, se faz possível analisar os impactos desta comorbidade intrauterina nos filhotes em nível metabólico e genético (GONZALEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2016), acompanhando o desfecho dessas alterações na fase adulta (FRANCIS *et al.*, 2020), com um tempo consideravelmente menor que em uma pesquisa clínica. A descrição de mecanismos subjacentes aos efeitos estudados é outro benefício da utilização deste modelo, uma vez auxilia na melhoria das intervenções clínicas.

Por se tratar de um protocolo menos invasivo, a intervenção dietética durante diferentes etapas da gestação do animal tem se mostrado um bom modelo indutor de RCIU, observado principalmente através do peso dos filhotes após o nascimento (HAUGAARD; BAUER, 2001). Uma das alterações alimentares bastante utilizada é a restrição proteica, mais especificamente com a disponibilização de apenas 8% de proteína para a gestante. Nesse modelo é possível observar uma hiperglicemia no 14º dia gestacional, aumentando os níveis de insulina e leptina circulante no 21º dia (FERNANDEZ-TWINN *et al.*, 2003). A restrição alimentar também induz o baixo peso nos filhotes, variando a severidade da redução nutricional, sendo aplicada em diferentes momentos da gestação. Quando analisado o comportamento dos filhotes que sofreram RCIU por este modelo, pode ser observado, entre outras alterações, um comprometimento na consolidação da memória de aprendizagem e espacial durante o período de *catch up* pós-natal (DURAN FERNANDEZ-FEIJOO *et al.*, 2017), expandindo as análises para o SNC. Além de sua utilidade nos estudos referentes à obesidade materna, o modelo de dietas ricas em gordura tem se mostrado indutor de baixo peso nos filhotes, juntamente com a

redução da eficiência placentária e alterações na expressão gênica no fígado do feto (PANCHENKO *et al.*, 2016).

3 JUSTIFICATIVA

Existem muitos estudos na literatura abordando as alterações no ambiente intrauterino nos desfechos referentes ao desenvolvimento e amadurecimento do recém-nascido. A restrição de crescimento intrauterino apresenta diversos comprometimentos no desenvolvimento do feto, como retardo no desenvolvimento cognitivo, motor e um *catch up* precoce em crianças pequenas para a idade gestacional.

Pouco se sabe sobre as alterações metabólicas envolvidas nesse fenômeno, bem como qual o papel da baixa concentração de leptina no leite encontrada nessas mães, e como ele impacta nos parâmetros metabólicos e gênicos da mãe e dos filhotes. Com isso, um modelo animal experimental translacional se faz de extrema importância para estudar essas possíveis alterações metabólicas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo animal translacional que mimetize a baixa concentração de leptina no leite materno, verificando as alterações em suas concentrações séricas em mães e filhotes e suas repercussões na expressão gênica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a alteração no comportamento alimentar e no peso das ratas gestantes nos diferentes perfis dietéticos.
- Aferir se ocorreu redução de peso nos filhotes de ambos os sexos.
- Avaliar as concentrações de leptina e glicose no sangue dos filhotes de ambos os sexos no dia de seus nascimentos e das mães no dia pós natal 2.
- Coletar leite e verificar as concentrações de leptina no mesmo.
- Medir os níveis de expressão de leptina na gordura das ratas, dois dias após o nascimento de seus filhotes.
- Mensurar a expressão dos receptores de leptina no hipotálamo de filhotes no dia pós-natal 0 e nas mães no dia 2.

5 HIPÓTESES

As dietas utilizadas nesse trabalho irão induzir restrição de crescimento intrauterino, verificado através do baixo peso ao nascer nos filhotes, reduzindo as concentrações de leptina no leite materno e irão influenciar as concentrações de seus receptores nos filhotes.

6 METODOLOGIA

6.1 MODELO ANIMAL

Foram utilizadas 28 fêmeas e 3 machos progenitores de ratos *Wistar*, com 45 dias de vida (peso 180-200g) obtidas pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre/Brasil. Os animais foram alocados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com o controle de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade (40-60%), ciclo claro/escuro de 12 horas, água disponível *ad libitum* e alocados em caixa-moradia confeccionada em *plexiglas* medindo 41x34x16cm, com assoalho coberto de serragem. Para as análises moleculares foi utilizado filhote de cada sexo por ninhada, nos diferentes perfis dietéticos. O processo de habituação dos progenitores provenientes do CREAL teve a duração de 14 dias sem a manipulação dos pesquisadores, para que o animal se acostumar a rotina do biotério. Todos os procedimentos seguiram as Diretrizes para o Cuidado e Utilização de animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA/ Resolução Normativa nº30, 2016 CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do HCPA (nº20160399).

6.2 GRUPOS DIETÉTICOS

Todas as dietas utilizadas foram adquiridas na empresa PragSoluções® (São Paulo, Brasil) e acondicionadas no freezer -20°C até o início dos experimentos. Ocorreu a distribuição aleatória em quatro grupos dietéticos, conforme os seguintes padrões calóricos e de macronutrientes: Controle (CTL): dieta padrão *ad libitum* durante toda a gestação: 348,5Kcal/100g (11,6% de lipídios, 25,3% de proteínas e 63,1% de carboidratos); Dieta hipoproteica (HP): adaptada de Fança-Berthon e colaboradores (2009), *ad libitum* durante toda a gestação: 348,5Kcal/100g (11,6% de lipídios, 8% de proteínas e 80,4% de carboidratos); Dieta hiperlipídica (HL): adaptado de Cunha e colaboradores (2015), *ad libitum* durante toda a gestação: 459Kcal/100g (23% de lipídios, 25,3% de proteínas e 51,7% de carboidratos); Dieta

de restrição alimentar (RA): adaptado de Akitake e colaboradores (2015), com a restrição de 30% do total de ração consumida pelo grupo controle: 348,5Kcal/100g (11,6% de lipídios, 25,3% de proteínas e 63,1% de carboidratos).

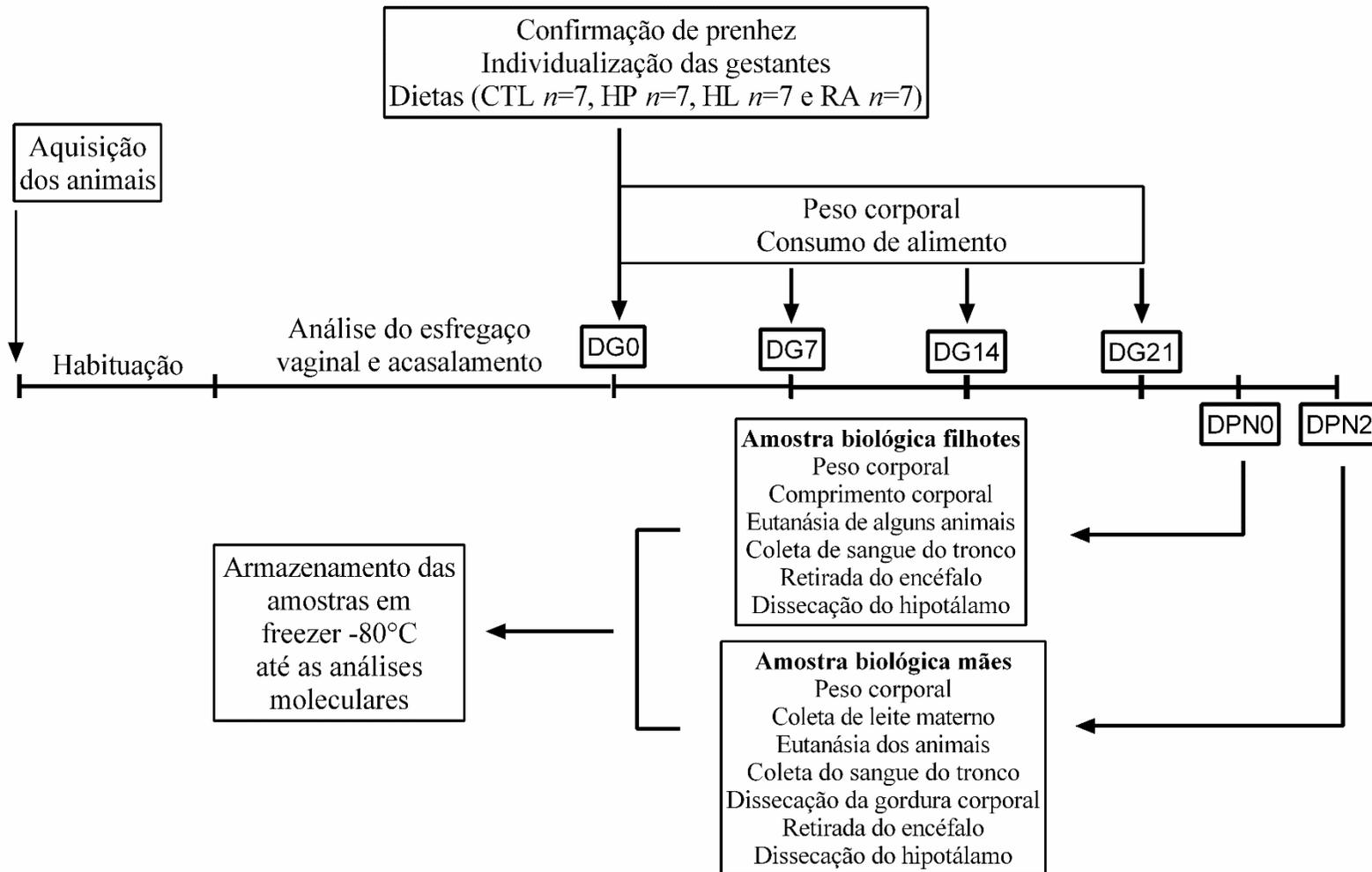
6.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Após o período de ambientação ocorre o protocolo de esfregaço vaginal para a verificação do período fértil dessas progenitoras. Quando confirmada a fase proestro, ocorreu o pareamento de um macho e uma fêmea em uma caixa-moradia para o acasalamento. No dia seguinte realizou-se a verificação de prenhez, com o isolamento das ratas confirmadas grávidas e início do grupo dietético até o 2º dia pós-natal (DPN). A pesagem da ração consumida, juntamente com o peso corporal materna foram realizados nos DG 0, 7, 14 e 21.

No DNP0, foi avaliado o comprimento do focinho até a ponta da cauda dos filhotes machos e fêmeas e o peso de total da ninhada. Oito horas após o nascimento, ocorreu a eutanásia de parte da ninhada, dissecado o hipotálamo, coletado o sangue do tronco, medido o nível de glicemia através de um glicosímetro e quantificada as concentrações de leptina no sangue. Quatro filhotes (dois machos e duas fêmeas) permaneceram com suas mães até o momento da coleta do leite, mantendo o perfil dietético dos grupos durante este período.

No DPN2 as fêmeas progenitoras foram pesadas, o leite coletado e eutanasiadas para a dissecação do tecido adiposo branco total, retirado o encéfalo e separação do hipotálamo, seguida do seu congelamento imediato por nitrogênio líquido. Todas as amostras biológicas foram armazenadas no freezer -80°C até o momento das análises moleculares (Figura 3).

Figura 3 – Desenho experimental do modelo de diferentes perfis dietéticos durante o período gestacional das ratas *Wistar*



CTL: dieta controle; HP: dieta hipoproteica; HL: dieta hiperlipídica; RA: dieta de restrição alimentar; DG: dia gestacional; DPN: dia pós-natal

6.4 COLETA DE LEITE

Para a obtenção do leite materno, foi realizado o protocolo de Muranish e colaboradores (2016), adaptado para ratos. Os filhotes foram isolados da mãe por 6 horas através de uma divisória de acrílico transparente, contendo furos para proporcionar os estímulos sensoriais responsáveis pelo acúmulo do leite nas ratas (olfatório, visual e auditivo). A caixa moradia permaneceu em uma incubadora a temperatura de 30°C e fluxo contínuo de O₂, em local isolado e monitorada a distância pelo pesquisador. Transcorrido o tempo de isolamento, a divisória era retirada, permitindo o cuidado materno por 10 min, a fim de realizar o estímulo mecânico de liberação do leite pelos filhotes. Após o fim deste período a rata foi anestesiada por isoflurano e mantida em fluxo contínuo de O₂ e anestésico durante todo o processo. Neste momento foi realizada a ordenha manual, coletando através de capilares de vidro, desprezando seu conteúdo em eppendorfs de 1,5 mL e armazenando em -80°C até o momento das análises bioquímicas. Todo o processo foi realizado sem a utilização de ocitocina, proporcionando a possibilidade de dosagem desse hormônio nas pesquisas futuras do grupo.

6.5 DOSAGEM DE LEPTINA NO LEITE E SANGUE

As amostras do leite materno foram centrifugadas a 1.000g por 15 minutos em uma temperatura de 4°C para a separação do soro. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1.500g por 10 minutos na mesma temperatura, separando o soro sanguíneo. Foi utilizado o kit comercial imunoenzimático para técnica de ELISA (Millipore®), para a realização da dosagem de concentração de leptina, seguindo o protocolo conforme as instruções dos fabricantes.

6.6 EXPRESSÃO GÊNICA DE LEPTINA E SEUS RECEPTORES

Os tecidos hipotalâmicos materno e dos filhotes foram homogeneizados e utilizados para a análise de expressão do receptor de leptina, por meio da técnica de Real-Time PCR (RT-PCR), utilizando sistemas de sondas TaqMan® (Life Technologies) específicas para os alvos. O mesmo processo de extração foi utilizado para a expressão de leptina na gordura corporal

total. Para estas análises, foi extraído o ácido ribonucleico (RNA) total, utilizando o protocolo do tampão de Trizol (Invitrogen), com posterior conversão para ácidos desoxirribonucleicos complementares (cDNA), através do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), para transcrição reversa, de acordo com instruções do fabricante. A expressão foi analisada pela quantificação de ampliações do produto utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK AND SCHMITTGEN, 2001).

6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado um teste de normalidade de kolmogorov-smirnov para verificar a distribuição amostral. Para a comparação das médias de expressão gênica entre os grupos de diferentes perfis dietéticos foi utilizada uma análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de um post hoc de Tukey, quando apropriado. Em todas as análises, o nível de significância utilizado foi estabelecido em 5%, com intervalo de confiança de 95%. Os dados foram analisados no programa *GraphPad Prism*, versão 6.0.

7 RESULTADOS

7.1 DADOS MATERNOS

7.1.1. Consumo alimentar

O consumo dietético foi calculado pela diferença entre o que foi ofertado de ração subtraído do que foi pesado de sobra. A média de consumo (gramas) dos 21 dias gestacionais no grupo HP ($21,30 \pm 2,34$) foi semelhante à do grupo CTL ($21,29 \pm 2,12$), apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os grupos HL ($16,07 \pm 1,98$) e RA ($14,36 \pm 0,23$). Referente ao consumo energético (kcal/100g), o grupo RA apresentou uma menor média ($50,05 \pm 0,79$) quando comparada aos demais grupos dietéticos ($p < 0,001$). O grupo HP ($1,70 \pm 0,19$) teve uma menor consumo proteico, em comparação as demais dietas ($p < 0,001$) (Tabela 1).

7.1.2. Peso corporal e do tecido adiposo branco

Referente ao peso corporal materno durante a gestação, foi observado uma diferença estatisticamente significativa do grupo RA em relação ao CT nos dias gestacionais 7 ($p=0,0275$), 14 ($p<0,001$) e 21 ($p<0,001$) (Figura 4A). Todos os grupos dietéticos apresentaram um peso menor que o grupo CT no último dia do período gestacional ($p<0,001$). Em relação ao peso do tecido adiposo branco, a razão entre o peso da gordura total e o peso corporal da rata se mostrou estatisticamente menor no grupo RA em relação aos demais grupos ($p=0,0037$) (Figura 4B).

7.1.3. Leptina no leite

Quanto a média de concentração (ng/mL) de leptina no leite, as ratas pertencentes ao grupo RA ($3,05\pm 0,55$), apresentaram uma menor concentração do hormônio quando comparadas ao grupo CT ($4,35\pm 0,44$), com uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,009$) (Figura 5). Os demais grupos dietéticos não se mostraram diferentes do grupo controle.

7.1.4. Expressão de leptina e seus receptores

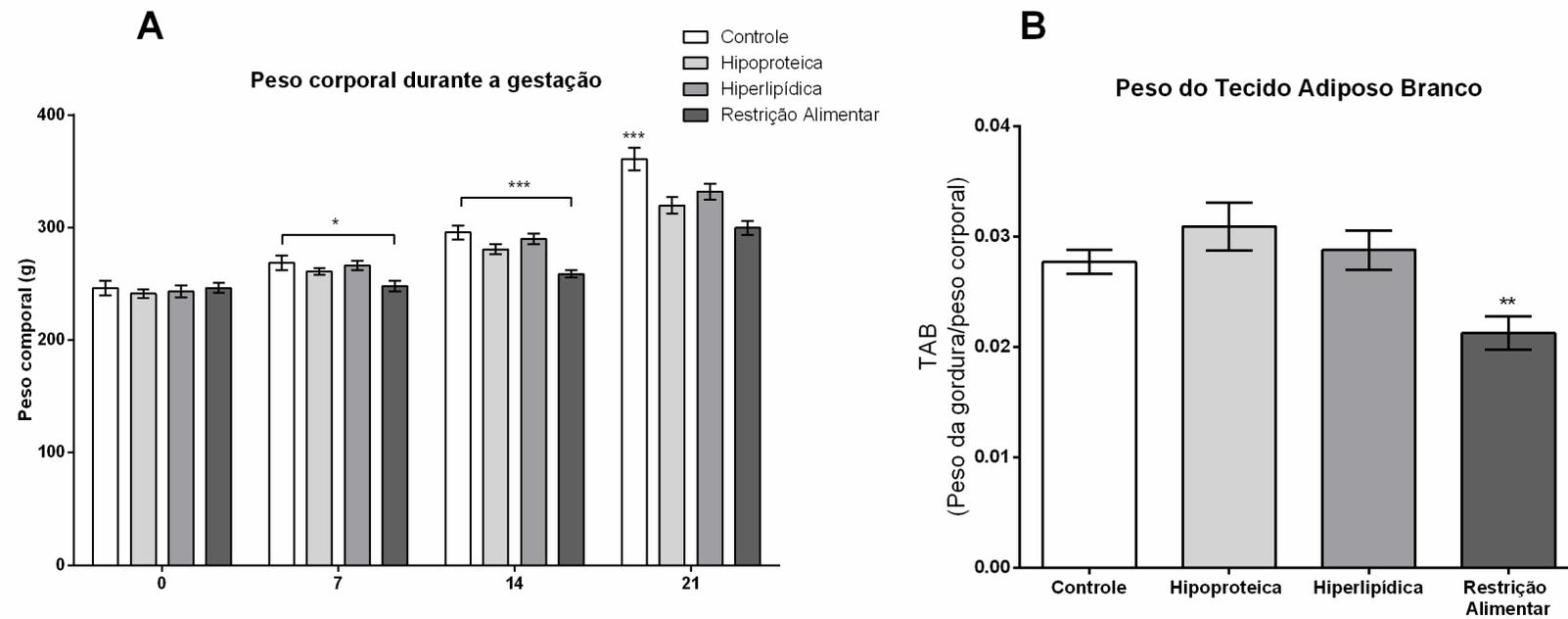
Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos em relação a expressão de leptina do tecido adiposo total materno. É observada apenas uma tendência de um aumento no $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das ratas do grupo HL ($2,00\pm 0,97$) em relação ao CT ($1,04\pm 0,20$; $p=0,0950$). Em relação aos receptores de leptina no hipotálamo, é observada um maior nível de expressão nos grupos HL ($1,49\pm 0,30$) e RA ($1,53\pm 0,31$), em relação ao CT ($1,02\pm 0,22$; $p=0,0021$) (Figura 6).

Tabela 1 – Tabela da média de consumo alimentar, energético e proteico de cada grupo dietético durante o período gestacional

Variáveis	Grupos Dietéticos				Valor de P
	Controle (n=8)	Hipoproteica (n=7)	Hiperlipídica (n=7)	Restrição Alimentar (n=7)	
Média de consumo (g)	21,29 ± 2,12 ^a	21,30 ± 2,34 ^a	16,07 ± 1,98 ^b	14,36 ± 0,23 ^b	<0,001
Média do consumo energético (Kcal/100g)	74,21 ± 7,38 ^a	74,24 ± 8,14 ^a	73,76 ± 9,09 ^a	50,05 ± 0,79 ^b	<0,001
Média de consumo proteico (g)	5,39 ± 0,54 ^a	1,70 ± 0,19 ^b	4,07 ± 0,50 ^c	3,63 ± 0,06 ^c	<0,001

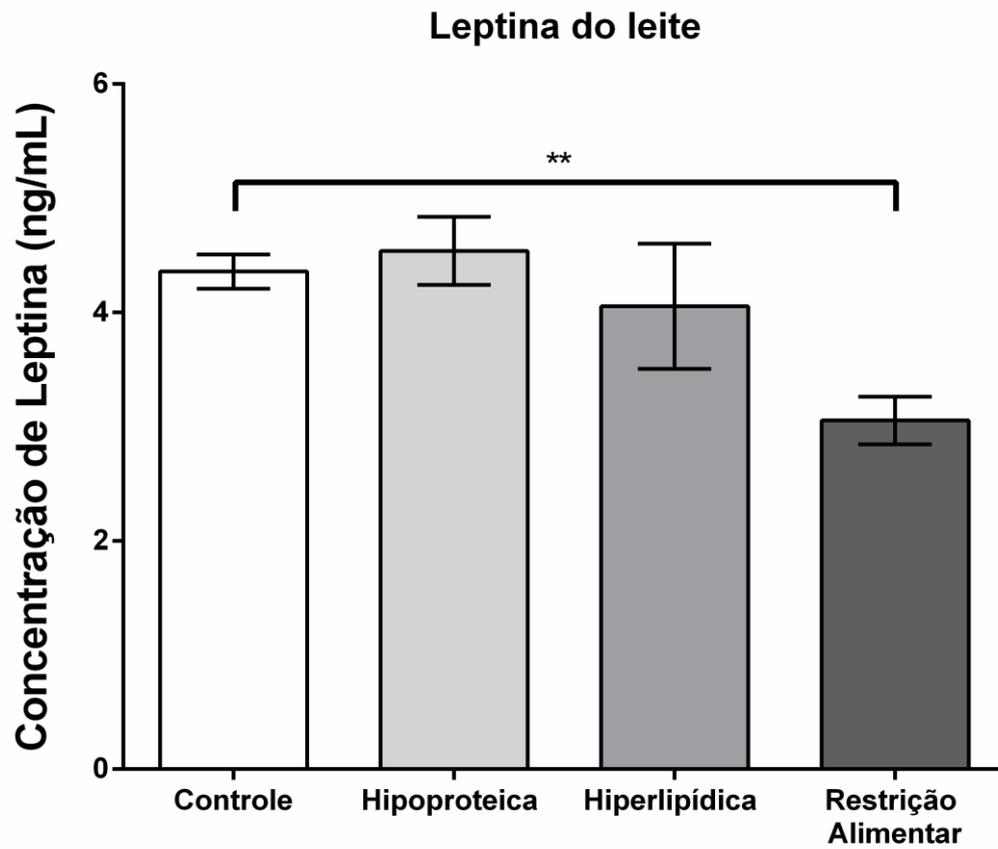
^{abc}Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas proporcionadas pelo teste de ANOVA de uma via seguido de um *post hoc* de Tukey. Valores representados por média ± desvio padrão. Nível de significância com $p \leq 0,05$.

Figura 4 – Comparação dos diferentes perfis dietéticos em relação ao peso (A) corporal durante os dias gestacionais 0, 7, 14 e 21 e (B) tecido adiposo branco (TBA) como a razão entre peso da gordura total em função do peso corporal



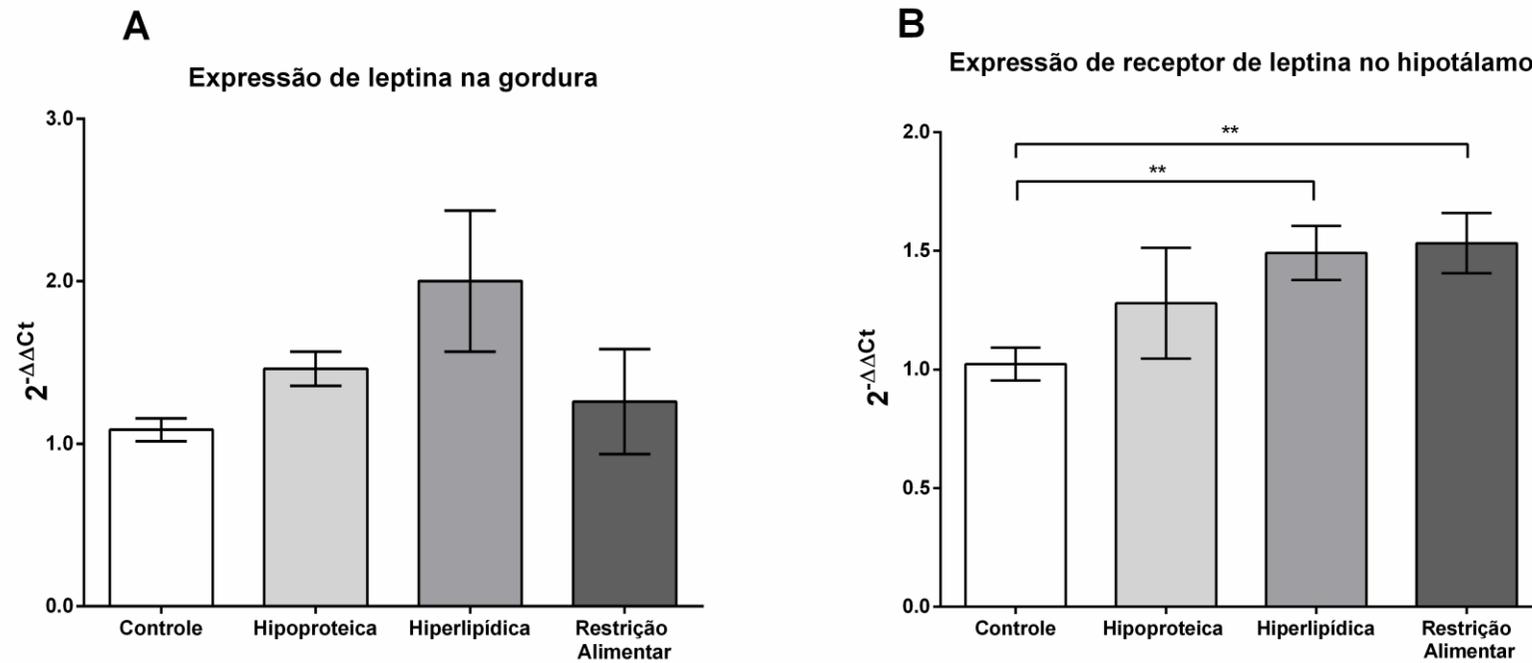
O peso corporal e de gordura total foi representado em média \pm desvio padrão. A diferença entre os grupos foi analisada através do teste de ANOVA de uma via, em cada período separadamente, seguido de um post hoc de Tukey. Nível de significância * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$, e $n = 7-6$ por grupo

Figura 5 – Dosagem de leptina no leite materno, dois dias após o nascimento dos filhotes em mães com diferentes perfis dietéticos durante o período gestacional



A concentração de leptina foi representada por média \pm desvio padrão, as diferenças entre os grupos foi através de ANOVA de uma via seguida de post hoc de Tukey. Nível de significância ** $p < 0,01$, $n = 7$ por grupo

Figura 6 – Comparação da expressão gênica dos diferentes perfis dietéticos durante o período gestacional de (A) leptina no tecido adiposo total e (B) dos seus receptores no hipotálamo



A expressão gênica foi representada por média \pm desvio padrão de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A diferença entre os grupos foi analisada através do teste de ANOVA de uma via, em cada período separadamente, seguido de um post hoc de Tukey. Nível de significância $**p < 0,01$ e $n = 6-5$ na leptina da gordura e $n = 7-6$ nos receptores de hipotálamo

7.2 DADOS DOS FILHOTES

7.2.1. Peso e comprimento

Em relação aos filhotes machos, foi observado uma menor média de peso (gramas) no grupo RA ($5,71 \pm 0,34$), quando comparada ao grupo CTL ($6,62 \pm 0,27$), com uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0007$) (Figura 7A). O mesmo efeito foi observado no comprimento (centímetros) desses filhotes, com o grupo RA ($4,50 \pm 0,06$) sendo menor que o grupo CTL ($4,78 \pm 0,10$, $p < 0,0001$) (Figura 7C). Nos filhotes fêmeas o perfil foi similar, com o grupo RA ($5,30 \pm 0,16$) e o grupo HP ($5,30 \pm 1,01$) apresentando um menor peso em relação ao grupo CTL ($6,32 \pm 0,20$, $p=0,0006$) (Figura 7B). Elas também apresentaram um comprimento no grupo RA ($4,36 \pm 0,30$) menor que o grupo CT ($4,78 \pm 0,08$, $p=0,0001$) (Figura 7D).

7.2.2. Glicemia do sangue no dia do nascimento

Quanto à concentração de glicose aferida no sangue dos filhotes ao zero dia de vida, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos, tanto nos filhotes machos quanto nas fêmeas, com valores similares entre os dois sexos (Figura 8).

7.2.3. Concentração de leptina do sangue no dia do nascimento

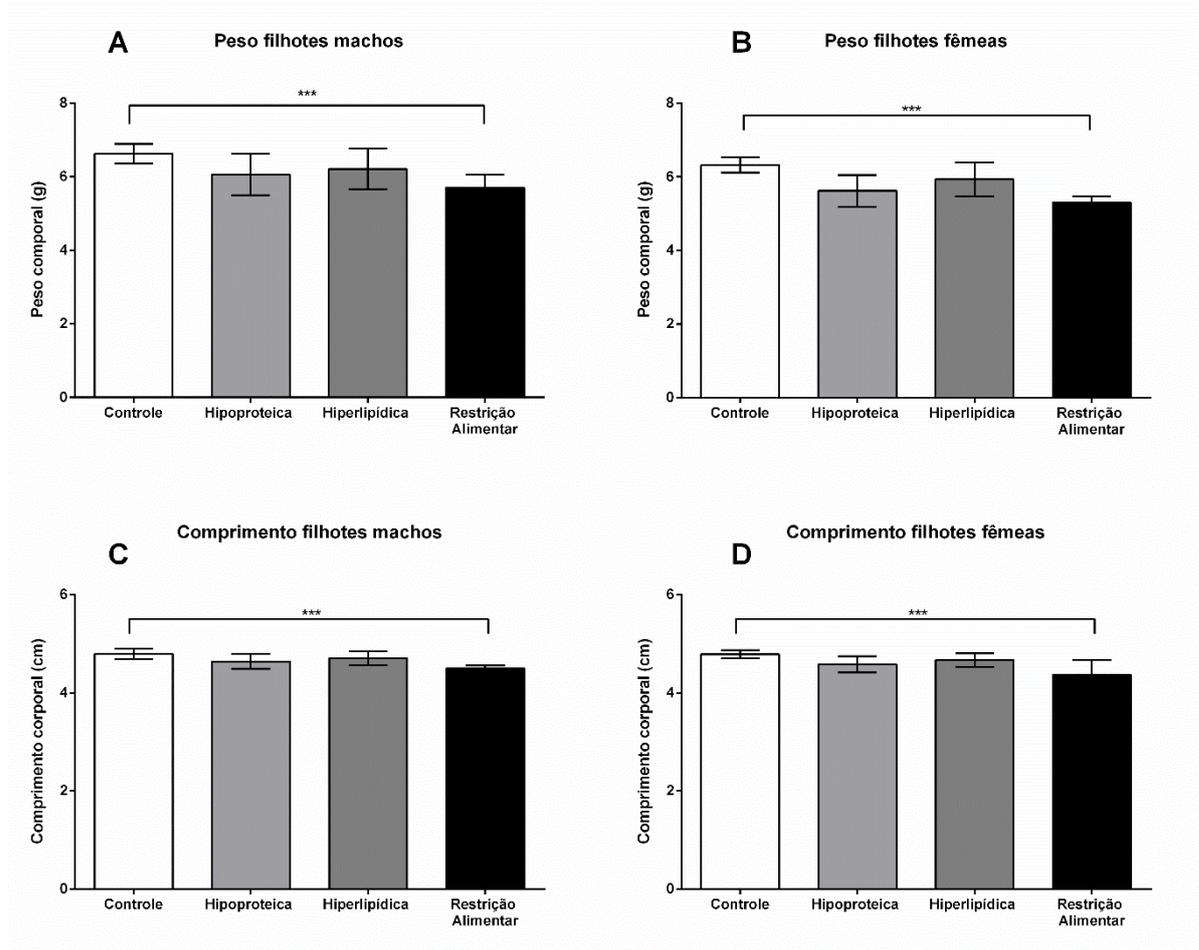
Na análise das concentrações de leptina dos filhotes machos, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa em todos os grupos dietéticos, com uma menor concentração (ng/mL) comparados ao grupo CT ($p=0,0274$) (Figura 9A). O mesmo efeito foi observado nas fêmeas, média menor nos grupos HP e HL quando comparadas ao grupo CT ($p=0,0198$) (Figura 9B).

7.2.4. Receptores de leptina

Em relação expressão dos receptores de leptina no hipotálamo dos filhotes machos, foi observado uma menor expressão no grupo HP ($0,52 \pm 0,22$) quando comparado ao grupo CT ($1,01 \pm 0,35$; $p=0,0246$) (Figura 10A). As fêmeas apresentaram um perfil de expressão gênica

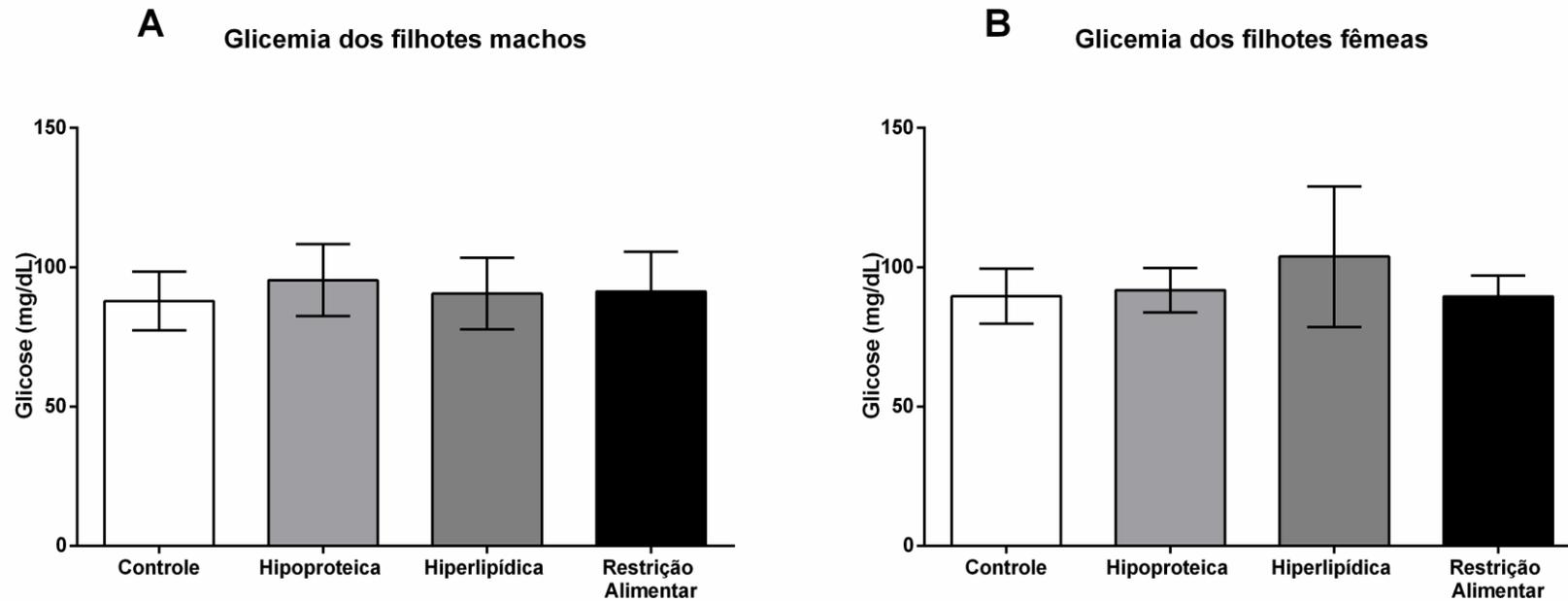
similar aos machos, mas sem uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,415$) (Figura 10B).

Figura 7 – Diferença entre as diferentes dietas maternas nos seus filhotes com zero dias de vida, através da análise antropométrica do peso de machos (A) e fêmeas (B), juntamente com o comprimento também de machos (C) e fêmeas (D)



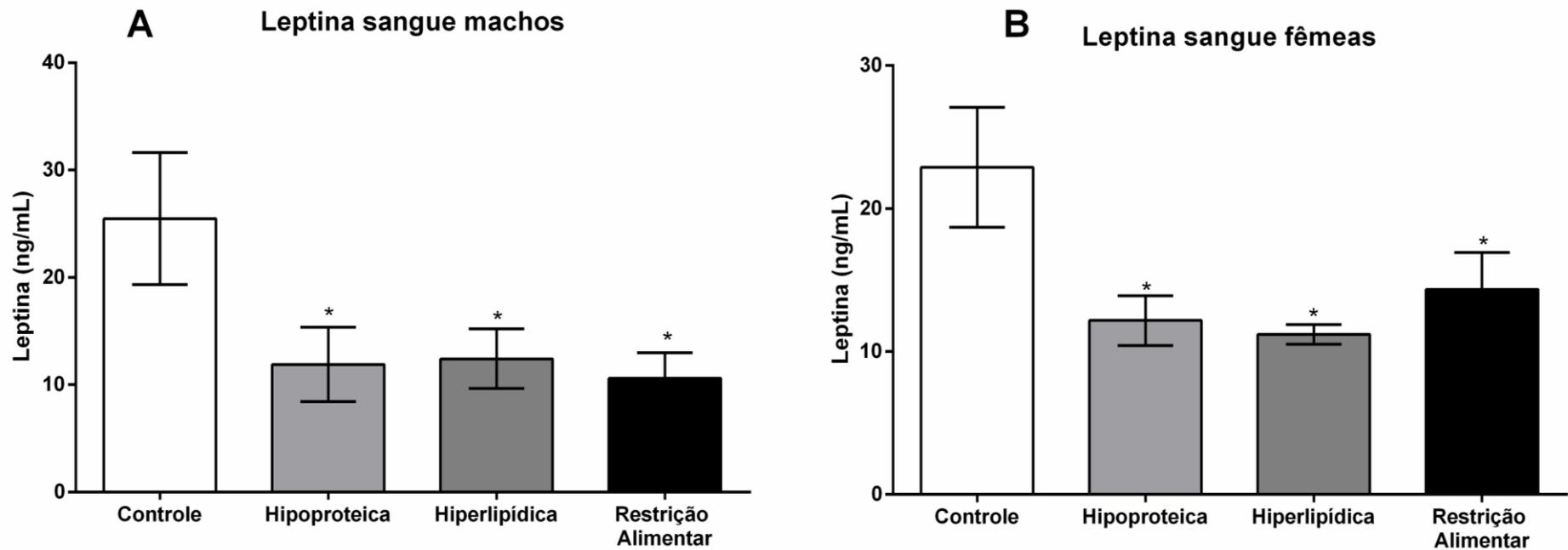
Eles foram representados em média \pm desvio padrão. A diferença entre as médias dos grupos foi analisada através do teste de ANOVA de uma via, seguido de um post hoc de Tukey. Nível de significância *** $p < 0,001$, e $n = 7-6$ filhotes por grupo

Figura 8 – Dosagem de glicose no sangue de filhotes machos (A) e fêmeas (B) com zero dias de vida, cujas mães foram submetidas a diferentes dietas durante a gestação



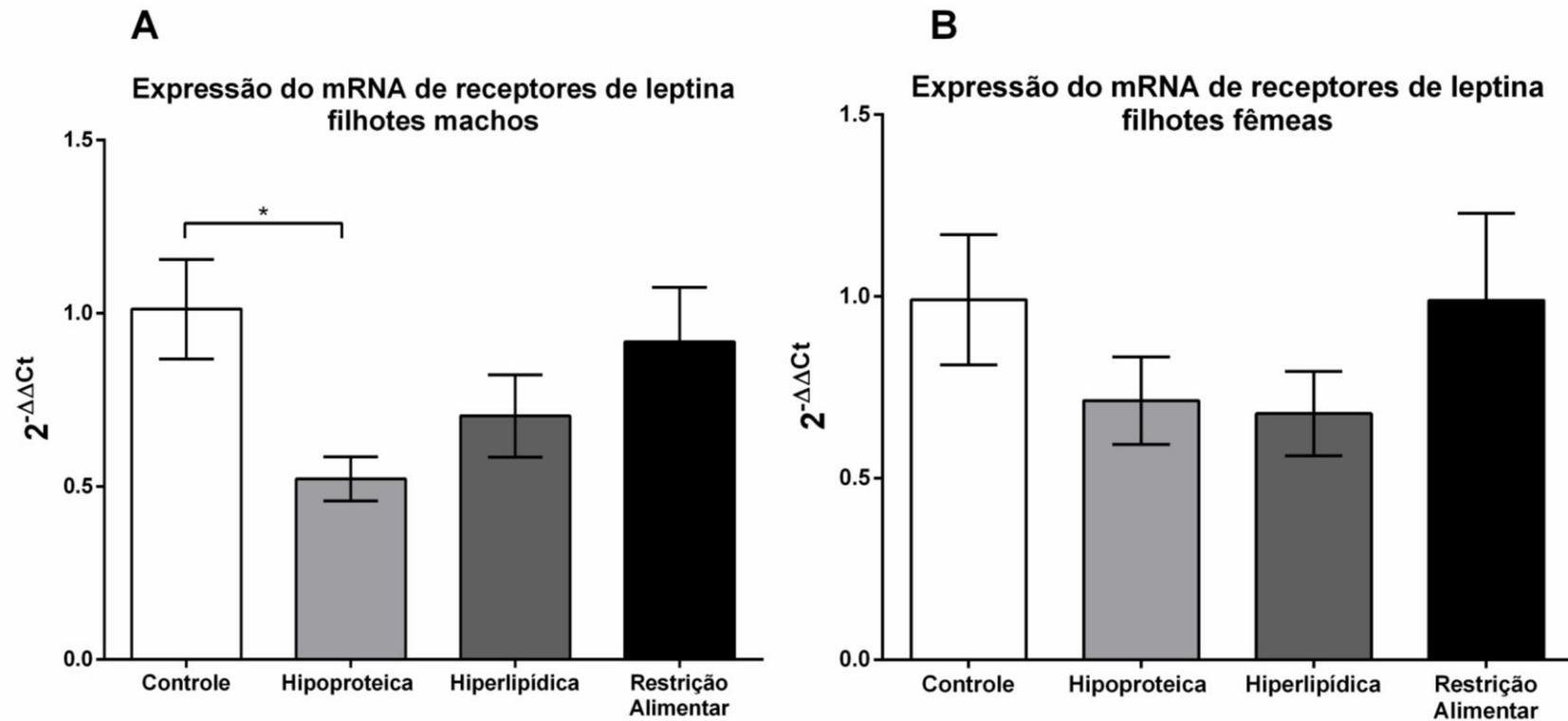
Os resultados foram representados em média \pm desvio padrão. A diferença entre as médias foi analisada através do teste de ANOVA de uma via, seguida do post hoc de Tukey. O nível de significância foi de $p < 0,05$ e o $n = 6-5$ filhotes por grupo

Figura 9 – Dosagem de leptina no sangue de filhotes machos e fêmeas no dia zero de vida, cujas mães foram submetidas a diferentes dietas durante a gestação



As concentrações de leptina foram representadas por média \pm desvio padrão. A diferença entre as médias foi analisada através do teste de ANOVA de uma via, seguido do post hoc de Tukey. Nível de significância * $p < 0,05$, $n = 5$ filhotes por grupo

Figura 10 – Expressão do mRNA de receptores de leptina no hipotálamo de filhotes macho e fêmeas com zero dias de vida, cujas mães foram submetidas a diferentes dietas durante a gestação



O nível de expressão gênica foi expresso em média \pm desvio padrão do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A diferença entre as médias foi analisada através do teste de ANOVA de uma via, seguido do post hoc de Tukey. Nível de significância * $p < 0,05$, $n = 6-5$ filhotes por grupo

8 DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho que mensura a concentração de leptina no leite de ratas submetidas a diferentes perfis indutores de RCIU, sem a injeção de ocitocina para a ejeção do leite. Isso possibilita a dosagem desse hormônio no futuro nessas amostras coletadas, amplificando o conhecimento dos principais mecanismos envolvidos no crescimento pós-natal do recém-nascido. Este trabalho também foi pioneiro na questão comparativa entre os modelos animais indutores de nascimentos PIG, aferindo as alterações de leptina tanto em nível proteico quanto genético nas mães e na sua prole de ambos os sexos, durante o período perinatal.

A média de consumo alimentar dos grupos CTL e HP foi parecida, o que era de se esperar uma vez que a quantidade calórica de ambas era a mesma. A média de ingestão energética da dieta HL ficou parecida com o controle, porém com um menor consumo, demonstrando uma alteração no comportamento alimentar desses animais devido à densidade calórica, corroborando com a literatura (RAMALHO *et al.*, 2017) (Tabela 1). Conforme o esperado, o grupo HP apresentou uma menor ingestão proteica que as demais dietas, comprovando que o mesmo efeito não foi encontrado no grupo RA, sendo este apresentando apenas o efeito da redução de todos os nutrientes.

O ganho de peso durante a gestação é um processo fisiológico que ocorre devido à formação e desenvolvimento do líquido amniótico e da placenta, aumento do tecido adiposo e pelo crescimento do feto (NATIONAL RESEARCH, 2010). Ele é influenciado, não apenas pelo status nutricional materno, mas também por outros fatores metabólicos fisiológicos placentários (CAMPOS *et al.*, 2019). Quando esse evento ocorre de maneira fraca ou não suficiente pode influenciar o desenvolvimento fetal, se manifestando através do baixo peso do recém-nascido (MASTELLA *et al.*, 2018), com uma associação a um aumento no risco de nascimentos de prematuros (GOU *et al.*, 2019), o que seria um possível preditor de RCIU, explicando o mesmo efeito encontrado nos grupos submetidos às diferentes dietas gestacionais

(Figura 4A). O tempo de exposição à dieta durante a gestação pode influenciar tanto em parâmetros maternos quanto dos filhotes. Griggio e colaboradores (1997) observaram que o impacto do ganho de peso nas ratas é muito mais severo após a segunda metade da gestação, com uma baixa perda desses parâmetros nos primeiros meses, comprovando também que uma dieta restritiva durante todo o período gestacional tem um efeito mais significativo na restrição de crescimento sofrida pelos filhotes, corroborando com nossos achados referentes ao peso e ao comprimento ao nascer desse grupo (Figura 7). Esse mesmo efeito é encontrado em humanos em mães que tiveram baixa ingestão nutricional durante a gestação, apresentando uma correlação entre o baixo ganho de peso e um escore z inferior de peso e comprimento nos recém-nascidos (ASHORN *et al.*, 2018).

Entre as alterações metabólicas sofridas na gestação, o metabolismo de lipídios apresenta uma importância significativa, bem como as alterações dos níveis de glicose e insulina. Durante esse período ocorre um aumento no depósito de tecido adiposo, sendo este a principal fonte de calorías para a mãe e para o feto em desenvolvimento, até o início da lactação (LAIN; CATALANO, 2007). A dieta hipoproteica durante a gestação pode resultar em um aumento da expressão de genes no fígado responsáveis por elevar os níveis de triglicérides e colesterol no sangue (SOSA-LARIOS *et al.*, 2017), o que indicaria a propensão a maior depósito de tecido adiposo branco encontrado nesse grupo (Figura 4B). Já o grupo RA, além de apresentarem RCIU resultando em filhotes com baixo peso e comprimento, tiveram uma menor quantidade de tecido adiposo branco total comparado com o CTL (Figura 4B). Estudos em humanos mostram que o suplemento adequado de ácidos graxos ao feto em formação é fundamental para evitar o risco de induzir o baixo peso ao nascer (BOBIŃSKI; MIKULSKA, 2015), reforçando a correlação entre baixa quantidade de tecido adiposo materno e o nascimento de filhotes FIG.

Durante o período gestacional a leptina apresenta uma ação importante no controle da homeostase energética materna, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento do feto (SZCZEPANKIEWICZ *et al.*, 2006). Esse hormônio apresenta em alta concentração em gestantes, quando comparadas com status de não grávidas, com uma contribuição tanto do tecido adiposo branco quanto da placenta, apresentando uma comunicação importante com o sistema imune (PÉREZ-PÉREZ *et al.*, 2017). Chung e colaboradores (2019) encontraram uma maior expressão de leptina no soro sanguíneo de ratas que realizaram uma dieta com alta concentração de gordura durante a gestação, o que poderia corroborar com a tendência encontrada do grupo HL encontrada neste trabalho (Figura 6A). O mesmo efeito ocorre em modelo com ratas *Wistar* submetidas a dieta rica em calorias durante a gestação, apresentando uma maior concentração de leptina no sangue (NEMATI *et al.*, 2017), como possível consequência do aumento da expressão no tecido adiposo branco.

Embora tenha apresentado uma leve propensão à maior expressão desse hormônio no tecido adiposo das progenitoras, os filhotes provenientes dos diferentes perfis dietéticos apresentaram uma baixa concentração sérica dele no dia do nascimento (Figura 9). Esse mesmo efeito foi encontrado em estudos com humanos, onde é observado em recém-nascidos de um ambiente onde ocorreu RCIU, uma correlação entre hormônios e fatores de crescimento com as baixas concentrações de leptina no sangue (LINNEMANN *et al.*, 2001; CHIESA *et al.*, 2008). Foi observado em filhotes machos de ratas com restrição alimentar durante a gestação, alterações na plasticidade neural nas regiões do hipotálamo, através da supressão das vias de sinalização regulatórias dos neurônios anorexígenos responsáveis pela regulação do apetite que resultam em hiperfagia na fase adulta (DESAI *et al.*, 2007).

A amamentação é um período que aumenta a demanda energética diária materna, uma vez que visa proporcionar os nutrientes necessários para o recém-nascido (BUTTE; KING, 2005). O leite materno pode ser influenciado diretamente por fatores maternos, genéticos ou

por características da criança, o que compromete tanto micro quanto macronutriente (KOCAADAM *et al.*, 2018). Mães que tiveram crianças pequenas para a idade gestacional apresentam diferenças na composição do leite materno, incluindo alterações em alguns micronutrientes (MATALOUN; LEONE, 2000) e macronutrientes como a baixa concentração de carboidratos (PHATTRAPRAYOON *et al.*, 2018). Em um modelo animal onde foi realizada uma restrição a produção de prolactina como uma resposta ao status de baixa nutrição materna foi observado uma baixa concentração de leptina no leite desses animais, mostrando a correlação entre esses dois hormônios e a ingestão alimentar da gestante (BONOMO *et al.*, 2005). Essa interação poderia explicar os achados encontrados no grupo RA deste trabalho (Figura 5). Utilizando modelo com redução de 50% do consumo alimentar durante metade da gestação e toda lactação, foi encontrado o mesmo efeito no leite coletado dois dias após o nascimento dos filhotes (WATTEZ *et al.*, 2014), podendo levar a alterações metabólicas posteriores nesses animais.

Transferência de leptina da circulação materna para o neonato através do LM apresenta uma contribuição para a programação metabólica durante o desenvolvimento infantil (CASABIELL *et al.*, 1997). Em modelos animais é possível observar, durante a lactação, a existência de um pico transitório na concentração desse hormônio nos filhotes, com um aumento na sua concentração a partir do DPN10, e um declínio após o desmame (NOZHENKO *et al.*, 2015). Essa modulação hormonal contribui para a maturação e desenvolvimento do SNC, principalmente na região do hipotálamo com um aumento na plasticidade neural e na expressão nos receptores de leptina (COTTRELL *et al.*, 2009). As alterações metabólicas que controlam a homeostase energética através do controle de ingestão alimentar, podem apresentar um efeito duradouro e irreversível no metabolismo do indivíduo (GRANADO *et al.*, 2012). Estudos correlacionando o sincronismo hormonal da díade mãe-criança, principalmente nos primeiros

estágios do aleitamento são fundamentais para a investigação da expressão fenotípica de doenças durante o crescimento e desenvolvimento infantil.

A grande maioria dos trabalhos da literatura com modelos animais que exploram as alterações no leite materno, ocorre a injeção ou administração de ocitocina para que proporcione uma maior quantidade de material biológico para coleta (DEPETERS; HOVEY, 2009). Este procedimento pode alterar algumas composições do leite como o seu perfil hormonal, quantidade de microRNAs e expressão gênica nas células presentes (LOLLIVIER *et al.*, 2002; HASSIOTOU *et al.*, 2013). O período de coleta desses trabalhos varia entre o DPN 10-20, devido ao pico de produção do leite materno concomitante à ingestão e ganho de peso dos filhotes (KRINKE, 2000). A coleta realizada nesse trabalho através do protocolo adaptado de Muranishi e colaboradores (2016) é inédita em ratos *Wistar*, não só pelo período da coleta, mas pela possibilidade de dosagem da ocitocina nessas amostras no futuro.

Existe uma relação significativa entre o comportamento materno e do neonato, durante pós-parto e período de amamentação, e as concentrações sistêmicas de ocitocina (YOSHIHARA *et al.*, 2018). Estudos com modelos animais documentam o papel desse hormônio no vínculo entre mãe e sua prole, apresentando uma modulação nos seus receptores neurais em regiões específicas do hipotálamo (KIM; STRATHEARN, 2016). Os neurônios responsáveis pela liberação de ocitocina, podem funcionar como alvos principais dos neurônios anorexígenos responsivos à leptina, contribuindo para modificações na ingestão alimentar de recém-nascidos (LADYMAN *et al.*, 2010; BLEVINS; HO, 2013). O aumento de peso proporcionado pela comunicação entre esses dois neuropeptídios (BLEVINS; HO, 2013), é um dos principais motivos para se estudar suas concentrações no leite materno, bem como sua alteração em diferentes momentos do período de amamentação. Essas alterações, concomitante à expressão de seus respectivos receptores hipotalâmicos, podem contribuir para elucidar as

programações metabólicas envolvidas no *catch up* precoce de crianças pequenas para idade gestacional (NUNES *et al.*, 2017).

O receptor de leptina consiste de uma sequência de 1165 aminoácidos em humanos e 1162 em ratos (TARTAGLIA *et al.*, 1995). Mutações no seu gene levam à falta de sensibilidade à leptina, hiperfagia, obesidade e algumas anormalidades endócrinas, comprometendo também o sistema imune do indivíduo (DUGGAL *et al.*, 2011). Em modelos com ratos adultos, essa molécula é altamente expressa em algumas regiões específicas do hipotálamo, como o núcleo arqueado (ARC), hipotálamo ventromedial (VMH), hipotálamo dorsomedial (DMH), paraventricular (PVN), e ventral pré-mamilar (PMV) (WADA *et al.*, 2014), apresentando uma maior quantidade de seu mRNA nessas regiões no estado de jejum do animal (SAHU *et al.*, 2002). O aumento significativo encontrado no grupo HL (Figura 6B), pode ser observado em estudo com humanos, no qual gestantes que ingeriram uma quantidade calórica de alimentos ultraprocessados tiveram um aumento na expressão gênica do receptor de leptina (MARTINS *et al.*, 2018). As dietas indutoras de RCIU apresentaram uma leve tendência a uma maior expressão de receptores de leptina que o grupo controle, o que poderia ser explicado pelo aumento da produção de neurônios orexígenos e anorexígenos encontrado no hipotálamo de camundongos mães com a mesma comorbidade produzida por fármacos indutores de deficiência de doadores de metil (SABER CHERIF *et al.*, 2019).

A expressão dos receptores de leptina no hipotálamo dos filhotes de camundongos tem início entre os dias gestacionais 18 e 21 nas regiões do núcleo ARC e PMV, sendo identificada no ARC, PMV e DMH a partir do pós-natal 3 (UDAGAWA *et al.*, 2000; CARLO *et al.*, 2007). Embora exista uma produção basal de leptina durante a vida fetal e neonatal, a resposta anorexigênica induzida artificialmente por esse hormônio não é evocada em ratos recém-nascidos (ABDENNEBI-NAJAR *et al.*, 2011), provavelmente pelo fato da imaturidade da região ARC. Em ratos machos adultos, cujas mães sofreram restrição alimentar durante a

gestação, além de nascerem PIG, não apresentaram sintomas de obesidade na fase adulta quando administrado leptina no período perinatal comparados com os controles que receberam o mesmo tratamento (VICKERS *et al.*, 2008). Esse efeito pode ser devido à tendência de baixa expressão dos receptores desse hormônio no hipotálamo dos filhotes conforme os dados desse trabalho (Figura 10), tanto em machos quanto em fêmeas. Filhotes de ratas que tiveram uma restrição alimentar durante a gestação, apresentaram um aumento na expressão dos receptores no período perinatal e fase adulta (VICENTE *et al.*, 2004; MANUEL-APOLINAR *et al.*, 2010). Um efeito similar, mas não tão expressivo devido ao tamanho amostral, pode ser visto no grupo RA tanto em macho quanto em fêmeas. Embora a dieta HL não tenha induzido baixo peso nos filhotes conforme mostra a literatura, ela promoveu uma redução nos receptores de leptina, o que poderia levar à resistência a leptina encontrada na literatura, levando ao ganho de peso na fase adulta desses animais (FÉRÉZOU-VIALA *et al.*, 2007; HOWIE *et al.*, 2009).

A busca por marcadores envolvidos no sincronismo metabólico entre mãe e criança auxilia na compreensão dos principais causadores da manifestação fenotípica de doenças na fase adulta desses neonatos (SMILEY *et al.*, 2019). Existe uma correção da produção de cortisol pelo eixo HPA entre essa díade, com uma associação forte ao ambiente compartilhado e às experiências diárias em comum (PRATT *et al.*, 2017), o que reforça também a necessidade de inclusão de variáveis ambientais no modelo animal. Em estudo com humanos, foi observado um aumento na expressão de genes responsáveis pela produção de citocina e quimiocinas no colostro de mães que tiveram crianças com baixo peso ao nascer (ZAMBRUNI *et al.*, 2017). Esse delineamento de pesquisa, auxilia na identificação das rotas metabólicas responsáveis pelos desfechos neonatais desprovidos de uma análise empírica causal.

O comportamento materno pode ser classificado em dois tipos: a resposta direcionada ao recém-nascido e a resposta relacionada a ele (BRIDGES, 2015). Em modelos animais as respostas direcionadas aos filhotes podem incluir a construção de ninhos, lambidas e higiene

urogenital, e melhor posição materna para ejeção de leite para os filhotes (ORSO *et al.*, 2018). As respostas relacionadas aos filhotes incluem o aumento na agressividade materna para proteger a prole, aumento na ingestão de alimentos para anteder a demanda metabólica durante o período de lactação e redução da ansiedade (SMILEY *et al.*, 2019). Existe uma modulação neuroendócrina de comportamentos relacionados aos filhotes e adaptações fisiológicas de apoio à gravidez e ao aleitamento (EINION, 2017). Em humanos ocorrem mudanças no sistema cardiovascular, sistema respiratório, músculos esqueléticos, padrões de sono, homeostase da glicose e fisiologia intestinal (GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.*, 2017). A inclusão dessas análises dentro do modelo animal indutor de RCIU proposto por neste estudo, traria um enriquecimento para os estudos de DOHaD em modelos translacionais.

O período gestacional no qual ocorre a restrição nutricional materna pode ser fundamental para explicar os desfechos nos filhotes. Quando ocorre de maneira moderada durante toda a gestação, não provoca alterações em alguns parâmetros metabólicos como insulina e glicose (HOWIE *et al.*, 2012), semelhante aos achados dos filhotes encontrados (figura 8). O processo de formação e amadurecimento do hipotálamo depende de funções fisiológicas basais importantes, como neurogênese, migração neural, morte celular, crescimento axonal e sinaptogênese (BOURET, 2012). Cada processo ocorre em momentos distintos da gestação e no período pós natal, marcando assim janelas de desenvolvimento importantes de serem estudadas para possíveis intervenções. Modelos animais de RCIU induzida por restrição alimentar durante a gestação, mostraram que a leptina altera a regulação energética, manifestando obesidade no amadurecimento dos filhotes, quando associada a uma dieta rica em gordura (PROULX *et al.*, 2002; YURA *et al.*, 2008). Esses achados reforçam a importância dos estudos em modelos animais, principalmente abordando diferentes momentos do desenvolvimento dos filhotes.

Padronizar um modelo que mimetize os achados clínicos encontrados no nosso grupo de pesquisa é um dos principais pontos positivos desse trabalho, uma vez que irá contribuir para elucidar as alterações proporcionadas pela programação metabólica intrauterina. A coleta de leite sem injeção de ocitocina é a principal conquista deste estudo, uma vez que possibilita a dosagem inédita desse hormônio, bem como a expressão dos seus receptores no hipotálamo dos filhotes que sofreram restrição de crescimento intrauterino. Ao mesmo tempo, ele foi uma das principais deficiências, uma vez que recrutou grande parte do tempo de realização do projeto devido à falta de um protocolo para ratos na literatura. Outra fragilidade do trabalho está no tamanho amostral de algumas técnicas, principalmente referente aos filhotes, devido à baixa expressão basal dos genes analisados no dia pós-natal da coleta.

9 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora todas as dietas tenham induzido um baixo peso e comprimento nos filhotes, tanto em machos quanto em fêmeas, apenas a dieta de restrição alimentar durante a gestação apresentou essa diferença estatisticamente significativa. Esse perfil dietético indutor de restrição de crescimento intrauterino apresentou uma maior alteração metabólica à nível de expressão dos receptores de leptina no hipotálamo e suas concentrações séricas tanto maternas quanto na sua prole. Os níveis desse hormônio se mostraram menor que o controle no leite materno, indicando que esse modelo seria o mais indicado para o estudo translacional dos mecanismos moleculares responsáveis pelo *catch up* precoce de crianças nascidas pequenas para a idade gestacional encontrado por Nunes e colaboradores (2017). Esse é o primeiro estudo a utilizar um modelo de coleta de leite sem a injeção de ocitocina em ratas *Wistar* no segundo dia pós-natal dos filhotes. Isso permite não só a dosagem futura desse hormônio, mas também avaliar sua concentração no leite materno durante o período neonatal, comparando com o perfil do leite maduro nos estágios finais da amamentação.

REFERÊNCIAS

- ABDENNEBI-NAJAR, L. *et al.* Basal, endogenous leptin is metabolically active in newborn rat pups. **The Journal of Maternal- Fetal & Neonatal Medicine**, v. 24, n. 12, p. 1486-1491, dez. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250909>. Acesso em: 05 out. 2020.
- AE-NGIBISE, K. A. *et al.* Prenatal maternal stress and birth outcomes in rural Ghana: sex-specific associations. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 19, n. 1, out. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31664941>. Acesso em: 05 out. 2020.
- AKITAKE, Y. *et al.* Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring. **Nutrition Research**, v. 35, n. 1, p. 76-87, jan. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25433908>. Acesso em: 15 out. 2020.
- ALDERETE, T. L. *et al.* Associations between human milk oligosaccharides and infant body composition in the first 6 mo of life. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 6, p. 1381-1388, dez. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26511224>. Acesso em: 05 jun. 2020.
- ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; MEHRING LE-DOARE, K. Human breast milk: a review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**, v. 91, n. 11, p. 629-635, nov. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26375355>. Acesso em: 08 jun., 2020.
- ASHORN, P. *et al.* Co-causation of reduced newborn size by maternal undernutrition, infections, and inflammation. **Maternal & Child Nutrition**, v. 14, n. 3, p. 5, jul. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29316198>. Acesso em: 05 out. 2020.
- AWAMLEH, Z.; GLOOR, G. B.; HAN, V. K. M. Placental microRNAs in pregnancies with early onset intrauterine growth restriction and preeclampsia: potential impact on gene expression and pathophysiology. **BMC Medical Genomics**, v. 12, n. 1, p. 10, jun. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31248403>. Acesso em: 05 out. 2020.
- BARKER, D. J. *et al.* Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**, v. 2, n. 8663, p. 577-580, set. 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2570282>. Acesso em: 16 set. 2020.
- BARUT, F. *et al.* Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. **Diagnostic Pathology**, v. 5, p. 24, abr. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20412591>. Acesso em: 12 set. 2020.
- BAZAES, R. A. *et al.* Glucose and lipid metabolism in small for gestational age infants at 48 hours of age. **Pediatrics**, v. 111, n. 4 Pt 1, p. 804-9, abr 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12671116>. Acesso em: 05 out. 2020.
- BEAUCHAMP, B. *et al.* Low birth weight is associated with adiposity, impaired skeletal muscle energetics and weight loss resistance in mice. **International Journal of Obesity (London)**, v. 39, n. 4, p. 702-711, abr. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25091727>. Acesso em: 16 set. 2020.
- BJERREGAARD, A. A. *et al.* Mother's dietary quality during pregnancy and offspring's dietary quality in adolescence: Follow-up from a national birth cohort study of 19,582 mother-

offspring pairs. **Plos Medicine**, v. 16, n. 9, set. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31513597>. Acesso em: 05 out. 2020.

BLACK, R. E. Global Prevalence of Small for Gestational Age Births. **Nestle Nutrition Institute Workshop Series**, v. 81, jun. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26111558>. Acesso em: 07 out. 2020.

BLEVINS, J. E.; HO, J. M. Role of oxytocin signaling in the regulation of body weight. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 14, n. 4, p. 311-329, dez., 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24065622>. Acesso em: 16 set. 2020.

BOBIŃSKI, R.; MIKULSKA, M. The ins and outs of maternal-fetal fatty acid metabolism. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 3, p. 499-507, set. 2015. Disponível em: : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26345097>. Acesso em: 05 set. 2020.

BONOMO, I. T. *et al.* Prolactin inhibition in lactating rats changes leptin transfer through the milk. **Hormone and Metabolic Research**, v. 37, n. 4, p. 220-225, abr. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952081>. Acesso em: 23 set. 2020.

BOURET, S. G. Nutritional programming of hypothalamic development: critical periods and windows of opportunity. **International Journal of Obesity Supplements**, v. 2, n. Suppl 2, p. S19-24, dez. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27152149>. Acesso em: 05 set. 2020.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 36, n. 1, p. 178-196, jan. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25500107>. Acesso em: 12 set. 2020.

BRIFFA, J. F. *et al.* Leptin in pregnancy and development: a contributor to adulthood disease? **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 5, p. E335-350, mar. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516549>. Acesso em: 21 out. 2020.

BUTTE, N. F.; KING, J. C. Energy requirements during pregnancy and lactation. **Public Health Nutrition**, v. 8, n. 7a, p. 1010-1027, out. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16277817>. Acesso em: 05 out. 2020.

CAMPOS, C. A. S. *et al.* Gestational weight gain, nutritional status and blood pressure in pregnant women. **Revista de Saude Publica**, v. 53, p. 57, jul., 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31340349>. Acesso em: 07 out. 2020.

CAO-LEI, L. *et al.* Prenatal stress and epigenetics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 117, p. 198-210, maio 2017. ISSN 1873-7528. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28528960> . Acesso em: 07 out. 2020.

CARLO, A. S.; MEYERHOF, W.; WILLIAMS, L. M. Early developmental expression of leptin receptor gene and [125I] leptin binding in the rat forebrain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 33, n. 3, p. 155-163, maio 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17391913>. Acesso em: 12 out. 2020.

CASABIELL, X. *et al.* Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 12, p. 4270-4273, dez. 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398752>. Acesso em: 05 out. 2020.

- CATOV, J. M. *et al.* Maternal leptin across pregnancy in women with small-for-gestational-age infants. **The American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 196, n. 6, p. 245-270, jun. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17547894>. Acesso em: 07 out. 2020.
- CHIESA, C. *et al.* Ghrelin, leptin, IGF-1, IGFBP-3, and insulin concentrations at birth: is there a relationship with fetal growth and neonatal anthropometry? **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 550-558, mar. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202160>. Acesso em: 11 set. 2020.
- CHO, W. K.; SUH, B. K. Catch-up growth and catch-up fat in children born small for gestational age. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 59, n. 1, p. 1-7, jan. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26893597>. Acesso em: 05 set. 2020.
- CHUNG, E. *et al.* Maternal exercise before and during pregnancy alleviates metabolic dysfunction associated with high-fat diet in pregnant mice, without significant changes in gut microbiota. **Nutrition Research**, v. 69, n. 1, p. 42-57, set. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31670066>. Acesso em: 07 out. 2020.
- COTTRELL, E. C. *et al.* Developmental changes in hypothalamic leptin receptor: relationship with the postnatal leptin surge and energy balance neuropeptides in the postnatal rat. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 3, p. R631-639, mar. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144754>. Acesso em: 05 set. 2020.
- CUNHA, F. A. S. *et al.* Both food restriction and high-fat diet during gestation induce low birth weight and altered physical activity in adult rat offspring: the "Similarities in the Inequalities" model. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 20, mar. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25738800>. Acesso em: 07 out. 2020.
- D'SOUZA, A. M. *et al.* Leptin deficiency in rats results in hyperinsulinemia and impaired glucose homeostasis. **Endocrinology**, v. 155, n. 4, p. 1268-1279, abr. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24467741>. Acesso em: 05 out. 2020.
- DAS, U. N. A perinatal strategy to prevent coronary heart disease. **Nutrition**, v. 19, n. 11/12, p. 1022-1027, nov/dez. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14624957>. Acesso em: 05 out. 2020.
- DAYAN, J. *et al.* Adolescent brain development, risk-taking and vulnerability to addiction. **Journal of Physiology Paris**, v. 104, n. 5, p. 279-286, nov. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816768>. Acesso em: 12 out. 2020.
- DEPETERS, E. J.; HOVEY, R. C. Methods for collecting milk from mice. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 14, n. 4, p. 397-400, dez. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19936987>. Acesso em: 10 out. 2020.
- DESAI, M. *et al.* Programmed hyperphagia due to reduced anorexigenic mechanisms in intrauterine growth-restricted offspring. **Reproductive Sciences**, v. 14, n. 4, p. 329-337, maio 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644805>. Acesso em: 02 out. 2020.
- DEVASKAR, S. U.; CHU, A. Intrauterine growth restriction: Hungry for an answer. **Physiology (Bethesda)**, v. 31, n. 2, p. 131-46, mar. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26889018>. Acesso em: 03 jul. 2020.

- DOMANY, K. A. *et al.* Breast milk fat content of mothers to small-for-gestational-age infants. **Journal of Perinatology**, v. 35, n. 6, p. 444-446, jun. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25375840>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- DONERAY, H.; ORBAK, Z.; YILDIZ, L. The relationship between breast milk leptin and neonatal weight gain. **Acta Paediatrica**, v. 98, n. 4, p. 643-647, abr. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19141141>. Acesso em: 03 jul. 2020.
- DUGGAL, P. *et al.* A mutation in the leptin receptor is associated with *Entamoeba histolytica* infection in children. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 3, p. 1191-1198, mar. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21393862>. Acesso em: 13 out. 2020.
- DULLOO, A. G. Thrifty energy metabolism in catch-up growth trajectories to insulin and leptin resistance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 155-171, fev. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18279786>. Acesso em: 15 jul. 2020.
- DURAN FERNANDEZ-FEIJOO, C. *et al.* Influence of catch up growth on spatial learning and memory in a mouse model of intrauterine growth restriction. **Plos One**, v. 12, n. 5, p. 234-250 maio. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28542302>. Acesso em: 07 out. 2020.
- DÜNDAR, N. O. *et al.* Ghrelin and adiponectin levels in colostrum, cord blood and maternal serum. **Pediatrics International**, v. 52, n. 4, p. 622-625, ago. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20202158>. Acesso em: 15 set. 2020.
- EATON, M. *et al.* Complex patterns of cell growth in the placenta in normal pregnancy and as adaptations to maternal diet restriction. **Plos One**, v. 15, n. 1, p. 172-190, jan. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31917811>. Acesso em: 07 out. 2020.
- EINION, A. Hormonal physiology of childbearing: evidence and implications for women, babies and maternity care. **The Practising Midwife**, v. 20, n. 4, p. 31-34, abr. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30549960>. Acesso em: 10 set. 2020.
- FANÇA-BERTHON, P. *et al.* Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. **Pediatric Research**, v. 66, n. 1, p. 47-52, jul. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287349>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- FERNANDEZ-TWINN, D. S. *et al.* The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. **British Journal of Nutrition**, v. 90, n. 4, p. 815-822, out. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13129451>. Acesso em: 20 ago. 2020.
- FLEMING, T. P.; VELAZQUEZ, M. A.; ECKERT, J. J. Embryos, DOHaD and David Barker. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 6, n. 5, p. 377-383, out. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25952250>. Acesso em: 14 ago. 2020.
- FRANCIS, M. R. *et al.* Intrauterine growth restriction affects diaphragm function in adult female and male mice. **Pediatric Pulmonology**, v. 55, n. 1, p. 229-235, jan. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31535471>. Acesso em: 14 out. 2020.
- FRANCO, M. C. *et al.* Circulating renin-angiotensin system and catecholamines in childhood: is there a role for birthweight? **Clinical Science (London)**, v. 114, n. 5, p. 375-80, mar. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17953515>. Acesso em: 05 out. 2020.

FUKUOKA, H.; KUBOTA, T. One-Carbon Metabolism and Lipid Metabolism in DOHaD. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1012, n. 1, p. 3-9, ago. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29956189>. Acesso em: 03 out. 2020.

FÉRÉZOU-VIALA, J. *et al.* Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 3, set. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17553843>. Acesso em: 12 out. 2020.

GEORGE, A. D. *et al.* Breastfeeding a small for gestational age infant, complicated by maternal gestational diabetes: a case report. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 19, n. 1, p. 210, jun. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31226953>. Acesso em: 10 out. 2020.

GETE, D. G.; WALLER, M.; MISHRA, G. D. Effects of maternal diets on preterm birth and low birth weight: a systematic review. **British Journal of Nutrition**, v. 123, n. 4, p. 446-461, fev. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31711550> . Acesso em: 11 set. 2020.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, P. *et al.* Alterations in expression of imprinted genes from the H19/IGF2 loci in a multigenerational model of intrauterine growth restriction (IUGR). **The American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 5, p.167-179 may., 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26880735> >. Acesso em: 07 out. 2020.

GONZÁLEZ-MARISCAL, G. ; MELO, A. I. Bidirectional effects of mother-young contact on the maternal and neonatal brains. 2017. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1015, n. 1, p. 97- 116, abr. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31711550>. Acesso em: 11 set. 2020.

GOU, B. H. *et al.* Gestational diabetes: weight gain during pregnancy and its relationship to pregnancy outcomes. **Chinese Medical Journal (England)**, v. 132, n. 2, p. 154-160, jan. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30614859>. Acesso em: 14 set. 2020.

GOYAL, D.; LIMESAND, S. W.; GOYAL, R. Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease. **Journal of Endocrinology**, v. 242, n. 1, p. 105-119, jul., 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31091503> >. Acesso em: 10 set., 2020.

GRANADO, M. *et al.* Leptin in early life: a key factor for the development of the adult metabolic profile. **Obesity Facts**, v. 5, n. 1, p. 138-50, mar. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22433625>. Acesso em: 04 ago. 2020.

GRIGGIO, M. A. *et al.* The influence of food restriction during different periods of pregnancy. **International Journal of Food Science Nutrition**, v. 48, n. 2, p. 129-34, mar. 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9135776>. Acesso em: 04 out. 2020.

GROTE, V. *et al.* Breast milk composition and infant nutrient intakes during the first 12 months of life. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 2, p. 250-256, fev. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26419197>. Acesso em: 13 out. 2020.

HASSIOTOU, F. *et al.* Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. **Clinical & Translational Immunology**, v. 2, n. 4, p. 253-270 abr. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2550595>. Acesso em: 07 out. 2020.

HAUGAARD, C. T.; BAUER, M. K. Rodent models of intrauterine growth restriction. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences**, v. 28, n. 1, p. 10-22, ago. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25505951>. Acesso em: 08 out. 2020.

HINKLE, S. N. *et al.* Longitudinal changes in gestational weight gain and the association with intrauterine fetal growth. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 190, n. 1 p. 41-47, jul. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25978857>. Acesso em: 20 out. 2020.

HOWIE, G. J. *et al.* Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 4, p. 905-915, fev. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19103681>. Acesso em: 18 ago. 2020.

HOWIE, G. J.; SLOBODA, D. M.; VICKERS, M. H. Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 2, p. 298-307, jul. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018052> . Acesso em: 11 ago. 2020.

HUANG, X. *et al.* Identification of placental nutrient transporters associated with intrauterine growth restriction and pre-eclampsia. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 230-245 mar. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29499643>. Acesso em: 07 out. 2020.

ISGANAITIS, E. *et al.* Accelerated postnatal growth increases lipogenic gene expression and adipocyte size in low-birth weight mice. **Diabetes**, v. 58, n. 5, p. 1192-1200, maio. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208909>. Acesso em: 10 ago. 2020.

JAVADI, M. *et al.* Relationships between maternal characteristics and infant birth weight. **International Journal of Health Care Quality Assurance**, v. 32, n. 4, p. 688-697, maio. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31111782>. Acesso em: 10 out. 2020.

JORNAYVAZ, F. R. *et al.* Low birth weight leads to obesity, diabetes and increased leptin levels in adults: the CoLaus study. **Cardiovascular Diabetology**, v. 15, n.1, p. 208-223 maio. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27141948>. Acesso em: 08 out. 2020.

KIM, S.; STRATHEARN, L. Oxytocin and Maternal Brain Plasticity. **New Directions for Child and Adolescent Development**, v. 2016, n. 153, p. 59-72, set. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27589498>. Acesso em: 17 out. 2020.

KNÖFLER, M. *et al.* Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 18, p. 3479-3496, set. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31049600>. Acesso em: 07 out. 2020.

KOCAADAM, B.; KÖKSAL, E.; TÜRKYILMAZ, C. Are breast milk adipokines affected by maternal dietary factors? **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 31, n. 10, p. 1099-1104, out. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30157033>. Acesso em: 20 out. 2020.

KRINKE, G. J. The laboratory rat. 1.ed.Elsevier,London: Academic press. 2000.

LADYMAN, S. R.; AUGUSTINE, R. A.; GRATTAN, D. R. Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, n. 7, p. 805-817, jul.

2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20456605>. Acesso em: 07 set. 2020.

LAIN, K. Y.; CATALANO, P. M. Metabolic changes in pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 50, n. 4, p. 938-948, dez. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982337>. Acesso em: 12 set. 2020.

LAPPAS, M. *et al.* Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. **Journal of Endocrinology**, v. 186, n. 3, p. 457-465, set. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16135665>. Acesso em: 03 set. 2020.

LEE, A. C. *et al.* National and regional estimates of term and preterm babies born small for gestational age in 138 low-income and middle-income countries in 2010. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 1, p. 26-36, jul. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25103583>. Acesso em: 03 out. 2020.

LEE, A. C. *et al.* Estimates of burden and consequences of infants born small for gestational age in low and middle income countries with INTERGROWTH-21. **British Medical Journal**, v. 358, p. 256-270, n. 1, ago. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28819030>. Acesso em: 09 out. 2020.

LESSEUR, C.; CHEN, J. Adverse maternal metabolic intrauterine environment and placental epigenetics: Implications for fetal metabolic programming. **Current Environmental Health Reports**, v. 5, n. 4, p. 531-543, dez. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30267228>. Acesso em: 03 out. 2020.

LIND, M. V. *et al.* Dietary protein intake and quality in early life: impact on growth and obesity. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 20, n. 1, p. 71-76, jan. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27749711>. Acesso em: 12 out. 2020.

LINDEMANN, K. *et al.* Physiological and pathological regulation of feto/placento/maternal leptin expression. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, n. 2, p. 86-90, maio. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11356133>. Acesso em: 04 out. 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>. Acesso em: 04 jun. 2020.

LOLLIVIER, V. *et al.* Oxytocin and milk removal: two important sources of variation in milk production and milk quality during and between milkings. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 2, p. 173-186, 2002 mar./abr. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12216962>. Acesso em: 14 out. 2020.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, G. *et al.* Breastfeeding during pregnancy: A systematic review. **Women Birth**, v. 30, n. 6, p. 292-300, dez. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28642112>. Acesso em: 12 set. 2020.

MALENDOWICZ, L. K. *et al.* Leptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **International Review of Cytology**, v. 263, n.1, p. 63-102, abr. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17725965>. Acesso em: 13 ago. 2020.

- MANUEL-APOLINAR, L. *et al.* Fetal malnutrition affects hypothalamic leptin receptor expression after birth in male mice. **Archives of Medical Research**, v. 41, n. 4, p. 240-245, maio. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637365>. Acesso em: 01 ago. 2020.
- MARTIN, A. *et al.* Health impact of catch-up growth in low-birth weight infants: systematic review, evidence appraisal, and meta-analysis. **Maternal & Child Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 167-180 jan. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27002681>. Acesso em: 07 out. 2020.
- MARTINS, M. C. *et al.* Associations between obesity candidate gene polymorphisms (fat mass and obesity-associated (FTO), melanocortin-4 receptor (MC4R), leptin (LEP) and leptin receptor (LEPR)) and dietary intake in pregnant women. **British Journal of Nutrition**, v. 120, n. 4, p. 454-463, ago. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29893663>. Acesso em: 11 ago. 2020.
- MASTELLA, L. S. *et al.* Influence of maternal weight gain on birth weight: a gestational diabetes cohort. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 1, p. 55-63, fev. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29694632>. Acesso em: 01 set. 2020.
- MATALOUN, M. M.; LEONE, C. R. Human milk mineral intake and serum concentrations of calcium and phosphorus in newborn term infants: influence of intrauterine growth restriction. **Acta Paediatrica**, v. 89, n. 9, p. 1093-1097, set. 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11071091>. Acesso em: 12 set. 2020.
- MERICQ, V. *et al.* Longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion from birth to age three years in small- and appropriate-for-gestational-age children. **Diabetologia**, v. 48, n. 12, p. 2609-2614, dez. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16283238>. Acesso em: 07 ago. 2020.
- MORRISON, J. L. *et al.* Fetal growth restriction, catch-up growth and the early origins of insulin resistance and visceral obesity. **Pediatric Nephrology**, v. 25, n. 4, p. 669-677, abr. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20033220>. Acesso em: 12 set. 2020.
- MURANISHI, Y. *et al.* Method for collecting mouse milk without exogenous oxytocin stimulation. **Biotechniques**, v. 60, n. 1, p. 47-49, jan. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26757812>. Acesso em: 03 set. 2020.
- NATIONAL RESEARCH, C. **Weight gain during pregnancy: reexamining the guidelines**. National Academies Press, 2010.
- NEMATI, M. *et al.* High-fat diet effects on metabolic responses to chronic stress. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 123, n. 3, p. 182-191, jul. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28276709>. Acesso em: 27 out. 2020.
- NOZHENKO, Y. *et al.* Milk Leptin surge and biological rhythms of leptin and other regulatory proteins in breastmilk. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. 134-148 dez. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26680765>. Acesso em: 07 out. 2020.
- NUNES, M. *et al.* Could a remarkable decrease in leptin and insulin levels from colostrum to mature milk contribute to early growth catch-up of SGA infants? **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 17, n. 1, p. 212-230 dez. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29212463>. Acesso em: 08 out. 2020.

- OLIVEIRA, L. L. *et al.* Maternal and neonatal factors related to prematurity. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 50, n. 3, p. 382-389, maio/jun. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27556707>. Acesso em: 13 out. 2020.
- ONG, K. K. *et al.* Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. **British Medical Journal**, v. 320, n. 7240, p. 967-971, abr. 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753147>. Acesso em: 04 out. 2020.
- ORSO, R. *et al.* Maternal behavior of the mouse dam toward pups: implications for maternal separation model of early life stress. **Stress**, v. 21, n. 1, p. 19-27, jan. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29041860>. Acesso em: 23 set. 2020.
- PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. Immunology of breast milk. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 6, p. 584-593, set. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27849237>. Acesso em: 12 set. 2020.
- PALOU, M.; PICÓ, C.; PALOU, A. Leptin as a breast milk component for the prevention of obesity. **Nutrition Reviews**, v. 76, n. 12, p. 875-892, dez. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30285146>. Acesso em: 21 set. 2020.
- PANCHENKO, P. E. *et al.* Expression of epigenetic machinery genes is sensitive to maternal obesity and weight loss in relation to fetal growth in mice. **Clinical Epigenetics**, v. 8, n. 22, p. 743-758 fev. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26925174>. Acesso em: 07 out. 2020.
- PARISI, F. *et al.* Effect of human embryonic morphological development on fetal growth parameters: the Rotterdam Periconceptional Cohort (Predict Study). **Reproductive Biomedicine Online**, v. 38, n. 4, p. 613-620, abr. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30765260>. Acesso em: 16 jun. 2020.
- PEPE, G. *et al.* Bone maturation as a predictive factor of catch-up growth during the first year of life in born small for gestational age infants: a prospective study. **Frontiers in Endocrinology (Lausanne)**, v. 11, n. 7, p. 147, jan. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32265840>. Acesso em: 25 out. 2020.
- PHATTRAPRAYOON, N.; KRAISONSIN, N.; KANJANAPATTANAKUL, W. Comparison of breast milk compositions among mothers delivering small-for-gestational age, appropriate-for-gestational age, and large-for-gestational age infants. **Breastfeeding Medicine**, v. 13, n. 9, p. 627-630, nov. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30204487>. Acesso em: 12 jun. 2020.
- PICÓ, C. *et al.* Role of leptin present in maternal milk in the control of energy balance during the post-natal period. **Genes and Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 139-41, out. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18850165>. Acesso em: 18 jul. 2020.
- POON, L. C. *et al.* The first-trimester of pregnancy - A window of opportunity for prediction and prevention of pregnancy complications and future life. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 145, n.1, p. 20-30, nov. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29852233>. Acesso em: 08 jul. 2020 .
- PRATT, M. *et al.* Mother-child adrenocortical synchrony; Moderation by dyadic relational behavior. **Hormones and Behavior**, v. 89, n.8, p. 167-175, mar. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28131596>. Acesso em: 12 jul. 2020.

- PROULX, K.; RICHARD, D.; WALKER, C. D. Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. **Endocrinology**, v. 143, n. 12, p. 4683-92, dez. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446596>. Acesso em: 02 out. 2020.
- PÉREZ-PÉREZ, A. *et al.* Leptin action in normal and pathological pregnancies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 2, p. 716-727, fev. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29160594>. Acesso em: 22 out. 2020.
- PÉREZ-PÉREZ, A. *et al.* Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 35, n. 1, p. 71-84, jun. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28285098>. Acesso em: 18 out. 2020.
- RAMALHO, L. *et al.* Metabolic disturbances due to a high-fat diet in a non-insulin-resistant animal model. **Nutrition and Diabetes**, v. 7, n. 3, p. e245, mar. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28287629>. Acesso em: 11 jun. 2020.
- RASHID, H. U. *et al.* Post-traumatic stress disorder and association with low birth weight in displaced population following conflict in Malakand division, Pakistan: a case control study. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 20, n. 1, p. 166, mar. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32183725>. Acesso em: 06 jun. 2020.
- REID, I. R.; BALDOCK, P. A.; CORNISH, J. Effects of leptin on the skeleton. **Endocrine Reviews**, v. 39, n. 6, p. 938-959, dez. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30184053>. Acesso em: 11 out. 2020.
- SABER CHERIF, L. *et al.* Methyl donor deficiency during gestation and lactation in the rat affects the expression of neuropeptides and related receptors in the hypothalamus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, p. 233, oct. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31615150>. Acesso em: 07 out. 2020.
- SAHU, A.; NGUYEN, L.; O'DOHERTY, R. M. Nutritional regulation of hypothalamic leptin receptor gene expression is defective in diet-induced obesity. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 14, n. 11, p. 887-93, nov. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12421342>. Acesso em: 23 ago. 2020.
- SAVINO, F. *et al.* High serum leptin levels in infancy can potentially predict obesity in childhood, especially in formula-fed infants. **Acta Paediatrica**, v. 102, n. 10, p. e455-9, out. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23844562>. Acesso em: 20 out. 2020 .
- SCHANTON, M. *et al.* Involvement of leptin in the molecular physiology of the placenta. **Reproduction**, v. 155, n. 1, p. R1-R12, jan. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29018059>. Acesso em: 12 out. 2020.
- SCHNEIDER, U. *et al.* Developmental milestones of the autonomic nervous system revealed via longitudinal monitoring of fetal heart rate variability. **Plos One**, v. 13, n. 7, p. 201-217, ago. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30016343>. Acesso em: 21 set. 2020.
- SEDAGHAT, K.; ZAHEDIASL, S.; GHASEMI, A. Intrauterine programming. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 18, n. 3, p. 212, set. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25945232>. Acesso em: 17 set. 2020.

- SHARMA, D.; SHARMA, P.; SHASTRI, S. Genetic, metabolic and endocrine aspect of intrauterine growth restriction: an update. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 30, n. 19, p. 2263-2275, out. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27718783>. Acesso em: 12 jun. 2020.
- SMILEY, K. O. *et al.* Neuroendocrinology and Adaptive Physiology of Maternal Care. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 43, p. 161-210, ago. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31808002>. Acesso em: 11 out. 2020.
- SOSA-LARIOS, T. C. *et al.* Alterations in lipid metabolism due to a protein-restricted diet in rats during gestation and/or lactation. **Food & Function**, v. 17, n. 1, p. 212-230, dez. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29099131>. Acesso em: 08 jul. 2020.
- SZCZEPANKIEWICZ, D. *et al.* Leptin and its receptors in the course of pregnancy in the rat. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 17, n. 1, p. 95-9, jan. 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16328017>. Acesso em: 11 jun. 2020.
- TARTAGLIA, L. A. *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1263-71, dez. 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8548812>. Acesso em: 19 out. 2020.
- TRIANAFYLLOU, G. A.; PASCHOU, S. A.; MANTZOROS, C. S. Leptin and Hormones: Energy Homeostasis. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 45, n. 3, p. 633-45, set. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27519135>. Acesso em: 07 out. 2020.
- TURK, E. *et al.* Functional Connectome of the Fetal Brain. **The Journal of Neuroscience** v. 39, n. 49, p. 9716-9724, dez. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31685648>. Acesso em: 17 jul. 2020.
- UDAGAWA, J. *et al.* Expression of the long form of leptin receptor (Ob-Rb) mRNA in the brain of mouse embryos and newborn mice. **Brain Research**, v. 868, n. 2, p. 251-8, jun. 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854577>. Acesso em: 09 jun. 2020.
- VAN DER LENDE, T. *et al.* Leptin gene polymorphisms and their phenotypic associations. **Vitamins and Hormones Journal**, v. 71, n. 1, p. 373-404, ago. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112275>. Acesso em: 12 out. 2020.
- VAYSSIÈRE, C. *et al.* Fetal growth restriction and intra-uterine growth restriction: guidelines for clinical practice from the French College of Gynaecologists and Obstetricians. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 193, n. 8, p. 10-18, set. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16182295>. Acesso em: 09 out. 2020.
- VICENTE, L. L. *et al.* Malnutrition during lactation in rats is associated with higher expression of leptin receptor in the pituitary of adult offspring. **Nutrition**, v. 20, n. 10, p. 924-8, out. 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15474883>. Acesso em: 09 out. 2020.
- VICKERS, M. H. *et al.* The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1906-13, abr. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18187552>. Acesso em: 05 jul. 2020.

- WADA, N. *et al.* Leptin and its receptors. **The Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 61-62, n. 1, p. 191-9, nov. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25218975>. Acesso em: 07 out. 2020.
- WATTEZ, J. S. *et al.* Short- and long-term effects of maternal perinatal undernutrition are lowered by cross-fostering during lactation in the male rat. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 5, n. 2, p. 109-20, abr. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24847697>. Acesso em: 09 out. 2020.
- WEYERMANN, M. *et al.* Adiponectin and leptin in maternal serum, cord blood, and breast milk. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 2095-102, nov. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990422>. Acesso em: 21 out. 2020.
- WIT, J. M.; BOERSMA, B. Catch-up growth: definition, mechanisms, and models. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 15 Suppl 5, p. 1229-41, dez. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12510974>. Acesso em: 09 ago. 2020.
- WITKOWSKA-ZIMNY, M.; KAMINSKA-EL-HASSAN, E. Cells of human breast milk. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 22, n. 1, p. 112-125, out. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28717367>. Acesso em: 02 set., 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. UNICEF-WHO low birthweight estimates: levels and trends 2000-2015: United Nations Children's Fund (UNICEF) 2019.
- WU, G.; IMHOFF-KUNSCH, B.; GIRARD, A. W. Biological mechanisms for nutritional regulation of maternal health and fetal development. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 26 Suppl 1, p. 4-26, jul. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22742599>. Acesso em: 16 out. 2020.
- YOSHIHARA, C.; NUMAN, M.; KURODA, K. O. Oxytocin and Parental Behaviors. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 35, n. 8, p. 119-153, out. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28812267>. Acesso em: 08 set. 2020.
- YURA, S. *et al.* Neonatal exposure to leptin augments diet-induced obesity in leptin-deficient Ob/Ob mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 6, p. 1289-1295, jun. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18356830>. Acesso em: 18 jun. 2020.
- ZAMBRUNI, M. *et al.* Maternal and pregnancy-related factors affecting human milk cytokines among Peruvian mothers bearing low-birth-weight neonates. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 120, n. 1, p. 20-26, abr. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28399439>. Acesso em: 03 out. 2020.
- ZHANG, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, dez. 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236>. Acesso em: 16 out. 2020.