

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

BIANCA APARECIDA MANGERONA

**EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA E DO DIMORFISMO SEXUAL SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS E EXPRESSÃO DO RECEPTOR CB1 NO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS WISTAR JOVENS**

Alfenas/MG
2019

BIANCA APARECIDA MANGERONA

**EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA E DO DIMORFISMO SEXUAL SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS E EXPRESSÃO DO RECEPTOR CB1 NO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS WISTAR JOVENS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção de título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas - MG. Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão

Alfenas/MG
2019

BIANCA APARECIDA MANGERONA

“EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA E DO DIMORFISMO SEXUAL SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS E SOBRE A EXPRESSÃO DO RECEPTOR CB1 NO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS WISTAR JOVENS”.

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Biociências Aplicadas à Saúde pela
Universidade Federal de Alfenas . Área de
concentração: Neurociência e Comportamento

Aprovado em: 30/08/19

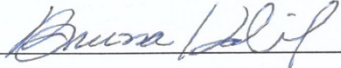
Profa. Dra. Sílvia Graciela Ruginsk Leitão
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Roseli Soncini
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Bruna Kalil
Instituição: Instituição: Universidade Federal de
Alfenas-MG – UNIFAL-MG

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

Em um momento tão especial como este eu não poderia deixar de agradecer a todos que contribuíram em minha caminhada humana e profissional nos últimos anos e que de alguma forma foram responsáveis pelo sucesso deste trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, aos professores, coordenadores e à secretária Adriana, por toda a dedicação e disponibilidade.

À Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade oferecida tanto na graduação como no mestrado, assim como ao Laboratório de Fisiologia da FMRP-USP, pela colaboração na realização de experimentos e análises.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

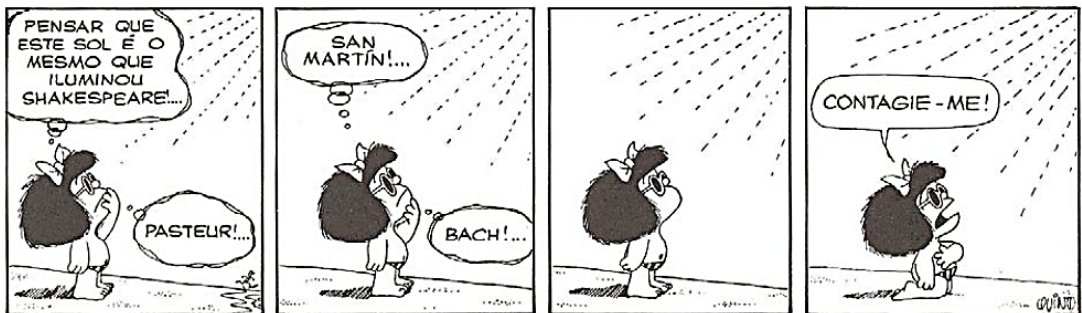
Gostaria também de expressar minha gratidão à Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão, por aceitar me orientar e embarcar comigo nessa jornada. Agradeço toda paciência e tempo dedicados a mim, os conhecimentos transmitidos e a confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, por todo o incentivo para que eu seguisse meus sonhos, por toda a compreensão nas minhas ausências e pelo amor incondicional em todos os momentos.

Agradeço aos servidores do Laboratório de Fisiologia, aos professores, técnicos e demais funcionários pelo apoio e disponibilidade. Um agradecimento em especial à Vanusa por todo seu carinho e atenção, por me acolher tão bem e se tornar minha “mãe alfenense”.

Meu muito obrigada aos estagiários, ICs, mestrandos, doutorandos e pós-docs da Fisiologia, assim como aos nossos queridos agregados do LATF e da Bioquímica, que com seu apreço e amizade fizeram do S304 minha segunda família e dividiram comigo aprendizados que vão muito além da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.



QUINO em Mafalda aprende a ler, 1999.

RESUMO

A obesidade é uma condição clínica grave que tem se tornado um dos principais problemas de saúde pública da atualidade. Sua origem é multifatorial, envolvendo fatores genéticos, metabólicos e comportamentais, os quais resultam em um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto calórico, com consequente balanço energético positivo e ganho de peso. Diversos mecanismos neuronais e endócrinos estão relacionados ao controle da homeostase energética, entre eles o sistema endocanabinóide (SEC), um sistema de neuroregulação cujo desequilíbrio tem sido considerado importante fator para o desenvolvimento e manutenção de quadros de obesidade. Utilizando o modelo experimental de ninhada reduzida [3 filhotes/ninhada (NR) vs 10 filhotes/ninhada (NN)] confirmamos em ratos de 21 e 60 dias a indução da obesidade precoce por superalimentação pós-natal por meio da análise de massa corporal, taxa específica de ganho de peso e massa dos depósitos de tecido adiposo branco perigonadal (TABp) e retroperitoneal (TABr). Também investigamos os efeitos do dimorfismo sexual sobre as ingestões alimentar e hídrica e o ganho de massa corporal, a massa relativa de tecidos relacionados à função endócrina e metabólica (adrenal, hipófise, tecido adiposo marrom – TAM e TABs), os perfis lipídico e glicêmico e a expressão do receptor canabinóide do tipo 1 (CB1) no hipotálamo ou de seu RNA mensageiro no TAB. No grupo de 21 dias, foi observado aumento significativo na massa corporal na prole originada de mães NR, bem como na massa TAM e dos TABp e TABr, menor expressão de CB1 após sobrecarga de glicose e diminuição nos níveis de RNAm para CB1 no TAB. No grupo de 60 dias foram encontrados aumentos na massa corporal, ingestão alimentar, TABp e TAB em ambos os sexos e aumento de RNAm para CB1 no TAB das fêmeas. Não foram encontradas diferenças significativas nas massas relativas da hipófise e da adrenal derivadas da redução da ninhada. Em relação ao perfil lipídico, tanto filhotes fêmeas quanto machos do grupo NR apresentaram apenas aumento nos níveis plasmáticos de colesterol total. No grupo de 60 dias houve aumento nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos e aumento na expressão de CB1 após a ingestão de glicose. O dimorfismo sexual, por sua vez, gerou diferenças na massa corporal, ingestão alimentar, e massas de TABp, TABr, hipófise e adrenal, assim como nos níveis de triglicerídeos, glicose e na marcação de CB1 no hipotálamo tanto nas proles NN quanto NR. Portanto, nosso trabalho mostra que o modelo de superalimentação pós-natal é eficaz em induzir a obesidade em animais jovens de ambos os sexos, influenciando nos parâmetros metabólicos estudados. Esses resultados demonstram a importância da nutrição como um fator de programação neonatal, determinando o desenvolvimento da obesidade na prole na vida adulta.

Palavras-chave: obesidade, ninhada reduzida, dimorfismo sexual, sistema endocanabinóide

ABSTRACT

Obesity is a serious clinical condition that has become one of the major public health problems at the present time. Its origin is multifactorial, involving genetic, metabolic and behavioral factors that result in an imbalance between intake and caloric expenditure, with consequent positive energy balance and weight gain. Several neuronal and endocrine mechanisms are related to the control of energetic homeostasis, including the endocannabinoid system (ECS), a neuroregulation system whose imbalance has been considered an important factor for the development and maintenance of obesity. Using the experimental model of reduced litter [3 pups/litter (SL) vs 10 pups/litter (NL)] we confirmed in 21- and 60-day-old rats the induction of early obesity by postnatal overfeeding by body mass analysis, specific rate of weight gain and the perigonadal (pWAT) and retroperitoneal (rWAT) stores of white adipose tissue. We also investigated the effects of sexual dimorphism on food and water intake and body mass gain, relative mass of tissues related to endocrine and metabolic function (adrenal, pituitary, brown adipose tissue - BAT and WAT), lipid and glycemic profiles and type 1 cannabinoid receptor (CB1) protein or messenger mRNA expression in the hypothalamus or WAT. In the 21-days group, there was a significant increase in body mass in offspring originated from SL mothers, as well as in BAT and pWAT and rWAT masses, lower expression of CB1 after glucose overload and decreased CB1 mRNA levels in rWAT. In the 60-day group, increases in body mass, dietary intake, pWAT and rWAT were found in both genders, as well as in female CB1 mRNA expression in rWAT. No significant differences were found in the relative pituitary and adrenal masses related to litter size. Regarding lipid profile, both female and male SL puppies showed only an increase in total cholesterol plasma levels, while the 60-day group showed an increase in triglyceride plasma concentrations and an increase in CB1 expression in response to glucose ingestion. Sexual dimorphism, in turn, resulted in differences in body mass, dietary intake and pWAT, rWAT, pituitary and adrenal masses, as well in triglyceride and glucose levels and CB1 expression in the hypothalamus in both NL and SL groups. Taken together, these results indicate that postnatal overfeeding was effective in inducing obesity in young animals of both genders, influencing metabolic parameters. Therefore, these results demonstrate the importance of nutrition as a factor of neonatal programming, determining the development of obesity in offspring during adulthood.

Key words: obesity, reduced litter, sexual dimorphism, endocannabinoid system

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Formação e inativação dos endocanabinóides	21
Figura 2 –	Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a evolução da massa corporal de machos e fêmeas provenientes de ninhadas normais ou reduzidas	32
Figura 3 –	Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a ingestão alimentar média semanal de machos e fêmeas provenientes de ninhadas normais ou reduzidas	33
Figura 4 –	Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a ingestão hídrica média semanal de machos e fêmeas provenientes de ninhadas normais ou reduzidas	34
Figura 5 –	Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a taxa específica de ganho de peso em animais de 21 e 60 dias provenientes de ninhadas normais ou reduzidas	34
Figura 6 –	Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a massa relativa dos depósitos perigonadal e retroperitoneal de tecido adiposo branco em animais de 21 e 60 dias provenientes de ninhadas normais ou reduzidas	35
Figura 7 –	Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a massa da hipófise, adrenal e tecido adiposo marrom em animais de 21 e 60 dias provenientes de ninhadas normais ou reduzidas	36
Figura 8 –	Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre as concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicerídeos em animais de 21 e 60 dias provenientes de ninhadas normais ou reduzidas	37
Figura 9 –	Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a glicemia em resposta ao teste de tolerância oral à glicose em machos e fêmeas de 21 dias e machos e fêmeas de 60 dias provenientes de ninhadas normais ou reduzidas.....	38
Figura 10 –	Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a área sob a curva de machos e fêmeas de 21 e 60 dias provenientes de ninhadas normais ou reduzidas	39

Figura 11 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a expressão do receptor CB1 no núcleo arqueado de machos e fêmeas de 21 e 60 dias	40
Figura 12 – Micrografias representativas do núcleo arqueado de machos e fêmeas de 21 dias de ninhadas normais ou reduzidas mostrando a marcação fluorescente para CB1	41
Figura 13 – Micrografias representativas do núcleo arqueado de machos e fêmeas de 60 dias de ninhadas normais ou reduzidas mostrando a marcação fluorescente para CB1	42
Figura 14 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a expressão do receptor CB1 no núcleo arqueado de machos e fêmeas de 21 e 60 dias	43
Figura 15 – Micrografias representativas do núcleo paraventricular de machos e fêmeas de 21 dias de ninhadas normais ou reduzidas mostrando a marcação fluorescente para CB1	44
Figura 16 – Micrografias representativas do núcleo paraventricular de machos e fêmeas de 60 dias de ninhadas normais ou reduzidas mostrando a marcação fluorescente para CB1	45
Figura 17 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a expressão de RNAm para CB1 no tecido adiposo branco de machos e fêmeas de 21 e 60 dias	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-araquidonil glicerol
AEA	anandamida
AgRP	proteína relacionada a agouti (agouti-related peptide)
ARC	núcleo arqueado
AUC	área sob a curva
BDNF	neurotrófico derivado do cérebro (brain-derived neurotrophic factor)
CART	transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (cocaine and amphetamine regulated transcript)
CB1	receptor canabinóide do tipo 1
CB2	receptor canabinóide do tipo 2
ChR2	canal de rodopsina 2 (channelrhodopsin 2)
Cnr1	gene do receptor canabinóide 1 (cannabinoidreceptor 1)
CRH	hormônio liberador de corticotropina (corticotropin-releasing hormone)
D2	deiodinase do tipo 2
DAG	1,2-diacilglicerol
DAGL α	diacilglicerol-lipase α
DAGL β	diacilglicerol-lipase β
DL	dia lactacional
DPN	dia pós-natal
ECB	endocanabinóide
EPM	erro padrão da média
FAAH	amida hidrolase de ácidos graxos (fatty acid amide hydrolase)
g	grama
GLP-1	peptídeo semelhante a glucagon 1 (glucagon-like peptide-1)
GPCR	receptor de membrana acoplado a proteína G (G protein-coupled membrane receptors)
Gq	proteína G quinase
HU-210	1,1-dimethylheptyl-11-hydroxytetrahydrocannabinol
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IMC	índice de massa corporal
kg	quilograma
KK	linhagem Kuo Kondo

LHA	área hipotalâmica lateral
MAGL	monoacilglicerol-lipase
MC4R	receptor da melanocortina 4 (melanocortin 4 receptor)
MCH	hormônio concentrador de melanina (melanin-concentrating hormone)
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
NaN ₃	azida de sódio
NAPE-PLD	N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina-fosfolipase-D
NAT	N-aciltransferase
NN	ninhada normal
NPY	neuropeptídeo Y
NR	ninhada reduzida
OLETF	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
PBS	tampão fosfato-salina
POMC	pró-opiomelanocortina (proopiomelanocortin)
PVN	núcleo paraventricular
rpm	rotações por minuto
SEC	sistema endocanabinóide
SF1	fator esteroideogênico-1 (steroidogenic factor 1)
SM	síndrome metabólica
SNC	sistema nervoso central
T3	tri-iodotironina
TAB	tecido adiposo branco
TAM	tecido adiposo marrom
TEGP	taxa específica de ganho de peso
TRKB	receptor da tirosina quinase B (tyrosine receptor kinase B)
TSH	hormônio estimulante da tireóide (thyroid-stimulating hormone)
TTOG	teste de tolerância oral a glicose
UCP-1	proteína desacopladora 1 (uncoupling protein-1)
VMH	núcleo ventromedial
Δ9-THC	Δ9-tetrahidrocanabidinol
μm	micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 OBESIDADE	14
2.2 MODELOS ANIMAIS DE OBESIDADE	15
2.3 PROGRAMAÇÃO METABÓLICA	18
2.4 O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E SUA PARTICIPAÇÃO NO CONTROLE DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA.....	20
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 JUSTIFICATIVA	25
5 MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 ANIMAIS	26
5.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE PARÂMETROS DO DESENVOLVIMENTO.....	27
5.3 TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE (TTOG)	28
5.4 EXTRAÇÃO DE ÓRGÃOS E TECIDOS	28
5.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	29
5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAM DE CB1	30
6 RESULTADOS	32
6.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE SUPERALIMENTAÇÃO COM A REDUÇÃO DA NINHADA	32
6.2 EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE A MASSA RELATIVA DE TECIDOS	36
6.3 EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE O PERFIL LIPÍDICO.....	37
6.4 EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE O PERFIL GLICÊMICO	38
6.5 EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE A EXPRESSÃO DO RECEPTOR CB1 NOS NÚCLEOS ARC E PVN.....	40
6.6 EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE A EXPRESSÃO DO RNAM PARA CB1 NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO	46
7 DISCUSSÃO	47
8 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
APROVAÇÃO DO CEUA	69

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma condição clínica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo. Ela vem sendo frequentemente associada ao desenvolvimento de graves distúrbios metabólicos, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial e até mesmo alguns tipos de câncer (GALLETTI et al, 2012; TEIXEIRA, 2014).

O excesso de peso tem se tornado cada vez mais comum em todas as faixas etárias. Estima-se que 25% da população mundial adulta – cerca de 1,9 bilhões de pessoas – esteja na classe de indivíduos com sobrepeso ou obesidade, sendo que a prevalência de indivíduos obesos é maior entre as mulheres, podendo em alguns casos chegar ao dobro da porcentagem vista no sexo masculino. Dentre crianças com até 5 anos de idade, tais valores chegam a 41 milhões, podendo alcançar o exorbitante número de 70 milhões de crianças obesas até 2025 (WHO, 2017). Esses dados preveem um alarmante cenário para um futuro próximo e colocam a obesidade como um dos principais problemas de saúde pública mundial da atualidade.

Embora seja comumente relacionada ao aumento da ingestão de alimentos altamente calóricos e ao crescente padrão de vida sedentária, o acúmulo de tecido adiposo gera aumento na produção de mediadores inflamatórios pelos adipócitos, resultando assim na classificação da obesidade como uma inflamação crônica de baixo grau (GALLETTI et al, 2012; TRIGO, 2016). Por outro lado, muitos dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes a esta síndrome são complexos e ainda não estão bem esclarecidos (SILVA et al, 2015).

As alterações neuroendócrinas relacionadas ao desenvolvimento da obesidade apontam para uma importante participação dos núcleos hipotalâmicos, por meio de suas complexas interações entre vias neuronais e hormonais responsáveis pela regulação da ingestão alimentar. Dentre eles, destacam-se a área hipotalâmica lateral (LHA) – conhecida como centro da fome, o núcleo ventromedial (VMH) – chamado de centro da saciedade, e os núcleos paraventricular (PVN) e arqueado (ARC), responsáveis pela produção, armazenamento e liberação de peptídeos anorexígenos e orexígenos (WILLIAMS, HARROLD, CUTLER, 2000; SCHWARTZ et al, 2001; MARANGON, 2011).

Dentre os sistemas que modulam estas vias neuronais, destacamos o sistema endocanabinóide central (SEC), composto por um conjunto de receptores, os ligantes endógenos [endocanabinóides – anandamida (AEA) e 2-araquidonil glicerol (2-AG)], e enzimas responsáveis pela síntese e degradação destes compostos. Os endocanabinóides (ECB) estão envolvidos na regulação de processos fisiológicos por todo o organismo, sendo que os receptores do tipo CB1 concentram-se mais no sistema nervoso central (SNC) e os do tipo CB2, nos órgãos periféricos. Dentre as áreas com grande concentração de receptores CB1 encontram-se os núcleos hipotalâmicos, especialmente os envolvidos com a manutenção da ingestão calórica e homeostase energética (GODOY-MATOS et al, 2006; ENGELI, 2008; DYALL, 2017), e o tecido adiposo branco, principal reserva energética do organismo (DI MARZO, PETROSINO, 2006).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 OBESIDADE

A obesidade é uma patologia complexa que constitui um grave problema para a saúde pública mundial, afetando tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (LACERDA et al, 2006; MARANGON, 2011; TEIXEIRA, 2014). Segundo a OMS, cerca de 1,9 bilhões de indivíduos adultos estavam acima do peso em 2016, sendo que mais de 650 milhões destes eram considerados obesos. Quando comparamos com dados de 1975, constatamos que a incidência de obesidade mundial quase triplicou neste intervalo de tempo, evidenciando assim as alarmantes proporções que tal doença vem alcançando nos últimos anos (ROCHA, 2013; WHO, 2017). No Brasil, a prevalência de sobrepeso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) em indivíduos acima de 18 anos é de cerca de 56,5%, enquanto a de obesidade ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) chega a 22,1% da população, revelando ter sofrido um aumento de quatro vezes quando comparada às décadas anteriores (WHO, 2017).

Embora o crescimento no número de indivíduos obesos seja evidente em ambos os sexos, a prevalência da obesidade em mulheres é superior a encontrada em homens (WHO, 2017) e isso se correlaciona, dentre outros fatores, aos diferentes padrões de proporção, depósito e metabolismo de gorduras, assim como às diferenças em marcadores biológicos e ao papel do estrógeno sobre o tecido adiposo. Isso faz com que o sexo feminino possua maiores depósitos de gordura, a qual concentra-se mais na região subcutânea, enquanto o masculino apresenta uma maior tendência ao acúmulo de tecido adiposo na região abdominal e, conseqüentemente, maior risco cardiovascular (MITTENDORFER, 2005; POWER, SCHULKIN, 2008).

A origem da obesidade é multifatorial e envolve interações entre aspectos metabólicos, genéticos, psíquicos, sociais e comportamentais (SHASHIKIRAN, SUDHA, JAYAPRAKASHI, 2004; ROCHA, 2013; TEIXEIRA, 2014). O atual estilo de vida representado pela redução na prática de atividades físicas e aumento de dietas hipercalóricas, devido ao elevado consumo de alimentos ricos em gorduras, açúcares e sal, gera um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto calórico, resultando em um balanço energético positivo e conseqüente acúmulo de gordura corporal (HERMANUSSEN et al, 2006; ROCHA, 2013; SILVA et al, 2015). As interações

gênicas e ambientais também podem modificar o fenótipo do indivíduo ao longo do tempo e contribuir para o desenvolvimento da obesidade, assim como as interferências sobre a nutrição precoce nos períodos pré- e pós-natal e as causas monogênicas, como as mutações nos genes da leptina ou da pró-opiomelanocortina (POMC) ou em seus receptores (LEVIN, 2010; MOCARZEL, 2014; SILVA et al, 2015).

O ganho de peso derivado do excessivo acúmulo de gordura predispõe ao desenvolvimento de várias doenças, dentre elas a hipertensão arterial, dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e diversos tipos de câncer, como endometrial, de mama, próstata, fígado e cólon (BASTARD et al, 2006; MARANGON, 2011; ROCHA, 2013; WHO, 2017). Além dos aspectos metabólicos e físicos, o sobrepeso favorece também o desenvolvimento de problemas psicossociais, visto que a aparência corporal muitas vezes acaba sendo alvo de discriminação e exclusão social, contribuindo ainda mais para a diminuição da qualidade de vida destes indivíduos e para instalação de patologias como a depressão (ROCHA, 2013).

2.2 MODELOS ANIMAIS DE OBESIDADE

Devido à rápida e significativa progressão dos casos de obesidade, tornam-se necessários estudos na área, visando elucidar os mecanismos fisiopatológicos subjacentes às causas e consequências desta síndrome e fundamentar possíveis tratamentos. Dadas as diversas limitações para estudos em humanos, como questões financeiras e éticas (TEIXEIRA, 2014), os modelos animais, em especial aqueles que empregam murinos, têm sido cada vez mais utilizados no estudo da obesidade, uma vez que apresentam desenvolvimento semelhante ao dos humanos, mas contam com facilidade de manuseio, manutenção e curto período gestacional (LACERDA et al, 2006; TEIXEIRA, 2014). Os modelos de obesidade em roedores mais utilizados dividem-se em modelos neuroendócrinos, modelos genéticos e modelos nutricionalmente induzidos. Nas subseções seguintes, trataremos uma breve apresentação de cada um deles.

2.2.1 Modelo neuroendócrino

A administração subcutânea de L-glutamato monossódico nos primeiros dias do período neonatal gera acúmulo deste neurotransmissor, com consequente lesão hipotalâmica. Pelo fato de a barreira hematoencefálica ainda não estar completamente formada nessa fase do desenvolvimento, o glutamato consegue atravessá-la e acumular-se no SNC, lesionando assim neurônios das regiões pré-óptica e ARC. A degeneração dos neurônios localizados nesses locais resulta em diversas alterações endócrinas e no prejuízo às sinalizações de leptina e insulina nessas áreas, culminando em efeitos metabólicos sistêmicos (NEMEROFF et al, 1977; SOUZA, 1999; LACERDA et al, 2006; VOLTERA et al, 2008; TEIXEIRA, 2014).

2.2.2 Modelos genéticos

Estima-se que existam mais de 200 modelos genéticos de obesidade em murinos e eles podem ser divididos em monogênicos e poligênicos. Os modelos monogênicos consistem no desenvolvimento de modelos de obesidade extrema através da inibição de um determinado gene, gerando assim animais *knockout* para leptina (conhecidos como *ob/ob*), para receptores para leptina (chamados de animais *db/db*) ou outras moléculas importantes no equilíbrio energético, como o receptor 4 da melanocortina (MC4R) e o receptor da tirosina quinase B (TrkB) (LUTZ, WOODS, 2012; TEIXEIRA, 2014).

A leptina é um hormônio produzido de maneira diretamente proporcional ao número de adipócitos e age sobre o hipotálamo, comunicando ao SNC alterações nas reservas de tecido adiposo branco do organismo. Deste modo, a secreção deficiente de leptina ou diminuição da sensibilidade à sua sinalização leva à hiperfagia e diminuição do gasto calórico, resultando em um balanço energético positivo e consequente ganho de peso (RODRIGUES, SUPPLY, RADOMINSKI, 2003).

O MC4R, por sua vez, é um dos receptores do sistema da melanocortina, ao qual se ligam substâncias como o α -MSH. Por ser um derivado do POMC, a ligação deste hormônio ao MC4R ocasiona a inibição da ingestão alimentar,

consequentemente, a deficiência deste receptor dificultaria a ação do hormônio e resultaria em prejuízo à via anorexígena (BARSH, SCHWARTZ, 2002; RODRIGUES, SUPLICY, RADOMINSKI, 2003).

O receptor TrkB bem como seu ligante fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* – BDNF) estão envolvidos com o desenvolvimento e plasticidade neuronais, participando de processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência em diferentes regiões do SNC e, em especial, no hipotálamo, aonde exercem papel modulador da ingestão alimentar. Deficiências deste receptor têm sido relacionadas a aumento da hiperfagia e consequente quadro de obesidade (FERNANDES, FUJIWARA, MELO, 2011; MOSCA et al, 2012).

O modelo poligênico, por sua vez, é normalmente utilizado para avaliar interações entre a suscetibilidade genética e outras variáveis advindas do ambiente, alimentação ou metabolismo, visto que suas alterações gênicas, por si só, são incapazes de resultar no fenótipo obesogênico (MOSCA et al, 2012). Ele consiste principalmente em animais M16 – possuem desregulação na neurotransmissão dopaminérgica nos núcleos Accumbens e Estriado; animais OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) – com presença de alelos nulos para a síntese de receptores para o hormônio colecistocinina A; ou animais KK (linhagem Kuo Kondo) – apresentam hiperfagia, obesidade e altos níveis de insulina e glicose, sendo estes também muito utilizados como modelo de diabetes tipo 2 (CESARETTI, KOHLMANN, 2006; KANASAKI, KOYA, 2011; LUTZ, WOODS, 2012; SANTOS et al, 2014).

2.2.3 Modelos nutricionais

Um dos principais modelos de obesidade induzida nutricionalmente consiste na oferta de dietas hipercalóricas, com o objetivo de gerar um balanço energético positivo e consequente desenvolvimento da obesidade. Tais regimes mimetizam a dieta ocidental e podem consistir na adição de óleo de soja ou outras fontes de gordura à alimentação do animal (BARNES et al, 2003; LUTZ, WOODS, 2012) ou na administração de dietas de cafeteria, composta por alimentos processados altamente palatáveis e calóricos, como biscoitos, batata frita, salame, chocolate e bacon (SHEEPER et al, 1998; LOPEZ et al, 2003; ROSINI, DA SILVA, MORAES,

2012). Os ácidos graxos saturados derivados desses alimentos têm a capacidade de ligar-se a receptores microgliais e estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a destruição dos neurônios responsáveis pelo controle do apetite (MILANSKI et al, 2009) e favorecendo, assim, o aumento do consumo alimentar.

2.3 PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

A programação, de uma maneira geral, pode ser definida como um quadro de alterações permanentes no organismo decorrentes de períodos durante os quais o indivíduo foi submetido a algum desafio. Este estímulo ocorrido em períodos críticos de desenvolvimento – geralmente intrauterino, neonatal e infância – ocasiona mudanças irreversíveis na estrutura de órgãos, inclusive alterando permanentemente funções metabólicas (SILVA et al, 2015).

Ainda que não seja completamente compreendida a maquinaria subjacente à programação metabólica, acredita-se que mecanismos epigenéticos sejam os principais responsáveis por tais alterações. Dessa forma, as alterações na expressão gênica devido a metilações, acetilações e modificações em enzimas de transcrição resultam em mudanças fenotípicas (proliferação e diferenciação de grupos celulares específicos e funcionamento de órgãos e sistemas), sem que haja alteração no genótipo do indivíduo (SOUZA, TARALLI, 2012; MOCARZEL, 2014). Há também o bom aspecto relacionado ao controle epigenético, uma vez que os indivíduos podem, por meio de ações positivas durante estas fases críticas, modificar fatores de risco genéticos preexistentes.

As modificações permanentes derivadas de estímulos ambientais adversos, como alterações nutricionais maternas durante o desenvolvimento fetal que levam à exposição a um ambiente obesogênico, predispõem ao desenvolvimento de disfunções crônicas na vida adulta, como diabetes mellitus e obesidade. Assim, os estudos acerca das alterações epigenéticas decorrentes do estilo de vida mostram-se bastante atuais e permitem uma abordagem da nutrição dentro do contexto da prevenção de doenças (MOCARZEL, 2014; SILVA et al, 2015).

2.3.1 Programação metabólica pós-natal

O modelo de superalimentação pós-natal por meio da manipulação do número de animais da ninhada surgiu a partir da necessidade de se criar um modelo de obesidade “limpo”, no qual não existissem interferentes advindos do uso de fármacos ou dietas específicas, e que permitisse o estudo em diferentes fases do desenvolvimento (LACERDA et al, 2006; TRIGO, 2016). Tal modelo baseia-se no princípio de que o aporte nutricional no início do desenvolvimento desencadeia mecanismos que levam à programação metabólica e que esta programação pode causar mudanças adaptativas que podem permanecer por toda a vida do indivíduo (PLAGEMANN et al, 1999; SPENCER, TILBROOK, 2009). A praticidade e versatilidade desse tipo de indução foram os pontos chave que favoreceram a escolha deste protocolo para o modelo experimental do nosso estudo.

Os animais de ninhadas reduzidas, geralmente padronizados a proles de 3 ou 4 filhotes por mãe, têm maior acesso à alimentação e por isso apresentam uma ingestão alimentar superior à dos filhotes de ninhadas grandes (TEIXEIRA, 2014). Além disso, há indícios de que a redução da ninhada pode modificar tanto de maneira qualitativa quanto quantitativa a produção de leite, aumentando a porcentagem de gordura e o teor calórico do alimento (FIOROTTO et al, 1991; SHANKAR et al., 2008). Estes fatores contribuem para a contínua hiperfagia e aumento da adiposidade visceral, levando à indução precoce da obesidade (CONCEIÇÃO et al, 2011; TEIXEIRA, 2014).

Embora ainda não estejam bem esclarecidos os mecanismos responsáveis por estas alterações, acredita-se que a hiperfagia existente nestes animais seja derivada da diminuição da sensibilidade à leptina e à insulina (SCHWARTZ et al, 1996; PLAGEMANN et al, 1999) e ao mau funcionamento de núcleos hipotalâmicos vinculados ao controle do peso corporal, como o VMH e o ARC, cujos neurônios são responsáveis pela produção de peptídeos orexígenos, como neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada a agouti (AgRP), e anorexígenos – como POMC e peptídeo regulado por cocaína e anfetamina (CART) (WILLIAMS, HARROLD, CUTLER, 2000; LACERDA et al, 2006).

Ademais, tal modelo também vem sendo relacionado a alterações metabólicas periféricas características de quadros de obesidade e síndrome metabólica, como aumento da adiposidade abdominal e da resistência a insulina,

dislipidemia e desregulação de sistemas reguladores do apetite (HABBOU et al, 2013), reforçando mais ainda sua importância no estudo destas patologias.

2.4 O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E SUA PARTICIPAÇÃO NO CONTROLE DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA

O SEC é um sistema de neuromodulação envolvido em alterações metabólicas e endócrinas relacionadas à ingestão alimentar e ao balanço energético (FRANCISCHETTI, ABREU, 2006; SOUZA, 2012; COSTA et al, 2011). Tal sistema é constituído pelos ECB, pelas enzimas responsáveis por sua síntese e degradação e pelos receptores canabinóides, resultando em um complexo de sinalização distribuído por todo o organismo (FRANCISCHETTI, ABREU, 2006; GODOY-MATOS et al, 2006; COSTA et al, 2011; COTA, 2012; KRUK-SLOMKA et al, 2016; CHIRCHIGLIA, TORRE, CHIRCHIGLIA, 2017; DYALL, 2017).

Os ECBs são compostos endógenos derivados de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, especificamente o ácido araquidônico, sendo os ligantes mais estudados a AEA e o 2-AG (GODOY-MATOS et al, 2006; ENGELI, 2008; DYALL, 2017). Essas substâncias não são armazenadas nas vesículas sinápticas, tendo, portanto, sua produção regulada sob demanda. Além disso, elas realizam sinalização de maneira retrógrada, sendo produzidas no neurônio pós-sináptico e agindo no receptor CB1 expresso pelo terminal pré-sináptico (COSTA et al, 2011; ZAMBERLETTI, GABAGLIO, PAROLARO, 2017). A produção destes compostos, principalmente a partir de fosfolípidos de membrana, se dá por meio de estímulos extracelulares atuantes sobre receptores acoplados a proteína Gq, os quais resultam em despolarização neuronal e consequente aumento do cálcio intracelular, e/ou por meio da ativação direta de enzimas pelas proteínas Gq (GODOY-MATOS et al, 2006; ENGELI, 2008).

A AEA é majoritariamente sintetizada por meio da conversão de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina a N-araquidonil-fosfatidiletanolamina por meio da ação da enzima N-aciltransferase (NAT), seguida da hidrólise pela N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina-fosfolipase-D (NAPE-PLD). O 2-AG, por sua vez, tem como principal via de síntese a conversão de fosfoinosítídeos membranares a 1,2-

diacilglicerol (DAG), por meio hidrólise realizada pelas enzimas diacilglicerol-lipase α ou β (DAGL- α ou DAGL- β) (ELPHICK, EGERTOVA, 2001; DE PETROCELLIS, DIMARZO, 2009; COSTA et al, 2011; DYALL, 2017; ZAMBERLETTI, GABAGLIO, PAROLARO, 2017).

A degradação da AEA ocorre principalmente por metabolização pela enzima hidrolase de amidas de ácidos graxos (FAAH – *fatty acid amide hydrolase*) presente nos compartimentos intracelulares dos neurônios pós-sinápticos, enquanto a do 2-AG é feita principalmente pelas enzimas monoacilglicerol-lipase (MAGL) e domínios alfa/beta das hidrolases 6 e 12 (ABHD6 e ABHD12) (BREIVOGEL, SIM-SELLEY, 2009; COSTA et al, 2011; DYALL, 2017; ZAMBERLETTI, GABAGLIO, PAROLARO, 2017), conforme representado no esquema a seguir.

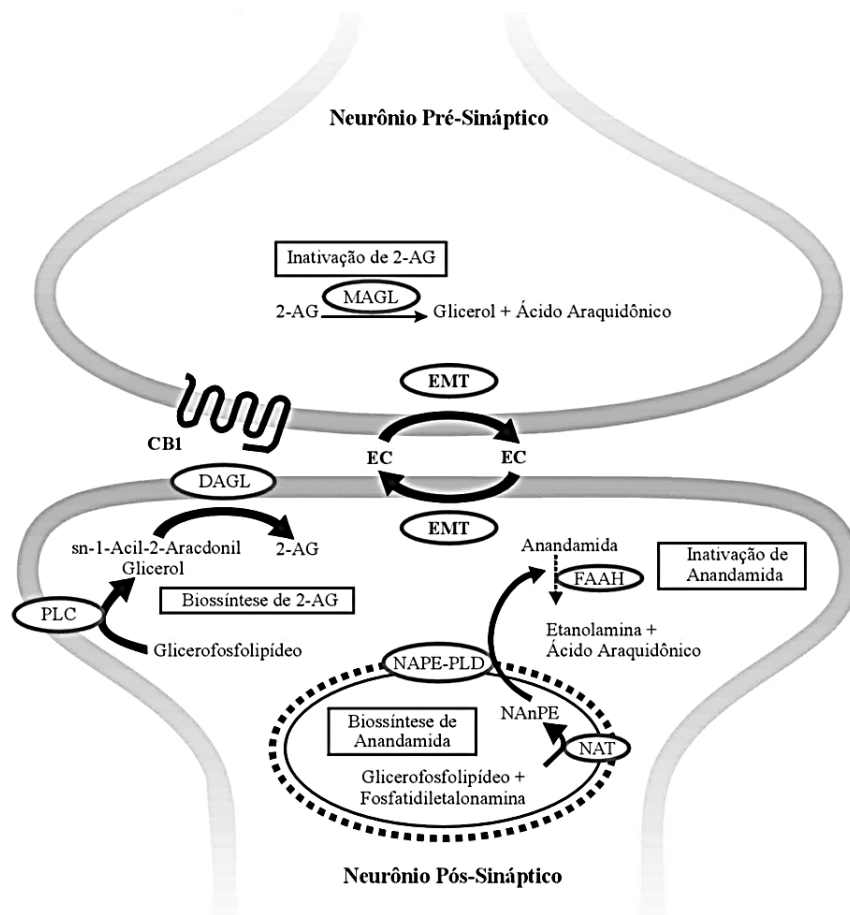


Figura 1: Formação e inativação dos endocanabinóides

Fonte: adaptado de GODOY-MATOS et al, 2006.

Os receptores canabinóides são membros da família de receptores acoplados a proteína G (*G protein-coupled membrane receptors* – GPCR), estando presentes,

em sua maioria, nos terminais axônicos dos neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos. Estes receptores apresentam duas isoformas, do tipo 1 (CB1) e do tipo 2 (CB2) (FRANCISCHETTI, ABREU, 2006; ENGELI, 2008). Embora os receptores CB1 estejam amplamente distribuídos no organismo, sua maior expressão encontra-se no SNC, ao passo que os receptores CB2 são predominantemente expressos na periferia, em células do sistema imune (FRANCISCHETTI, ABREU, 2006; ENGELI, 2008; SOUZA, 2012). Além dos agonistas canabinóides endógenos, esses receptores também podem ser ativados por fitocannabinóides, como o delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, derivado da *Cannabis sativa*), e por canabinóides sintéticos, como o 1,1-Dimethylheptyl-11-hydroxy-tetrahydrocannabinol (HU-210) (COSTA et al, 2011; ALVES, SPANIOL, LINDEN, 2012).

O SEC participa da modulação da ingestão energética de diferentes formas. A interação com vias mesolímbicas aumenta o desejo por alimentos que proporcionem prazer, devido à indução de maior liberação de dopamina em regiões envolvidas no sistema de recompensa, como o núcleo accumbens (FRANCISCHETTI, ABREU, 2006; SOUZA, 2012; LIPINA et al, 2013; CHIRCHIGLIA, TORRE, CHIRCHIGLIA, 2017). Já sua ação sobre regiões hipotalâmicas induz apetite, por meio do estímulo para produção ou inibição de mediadores orexígenos ou anorexígenos (FRANCISCHETTI, ABREU, 2006; GODOY-MATOS et al, 2006; AGUIRRE, CASTILLO, LLANOS, 2017).

Estudos indicam que os receptores CB1 estejam presentes em estruturas associadas à regulação da ingestão alimentar e peso corporal, sendo coexpressos com produtores do hormônio liberador de corticotropina (CRH) no PVN, hormônio concentrador de melanina (MCH) na LHA, CART no ARC e de pré-pró-orexina no VMH (FRANCISCHETTI, ABREU, 2006; GODOY-MATOS et al, 2006; PAGOTTO et al, 2006; CARDINAL et al, 2014; MOROZOV et al, 2017). Há evidências também da correlação entre o SEC e as concentrações de leptina, grelina, melanocortina, neuropeptídeo Y e peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1) (COTA et al, 2003; FRANCISCHETTI, ABREU, 2006).

Além de seu importante papel central, o SEC atua também em vários órgãos periféricos relacionados com metabolismo energético, como fígado e tecido adiposo branco, apresentando-se hiperativado em indivíduos obesos e participando, assim, de processos característicos da obesidade, como acúmulo de gordura e disfunções

envolvendo insulina e adiponectina (BLUHER et al, 2006; DI MARZO, PETROSINO, 2006; MATIAS et al, 2006), o que ressalta, mais uma vez, o importante papel modulador deste sistema nos circuitos neuronais e periféricos envolvidos na regulação do balanço energético.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre parâmetros metabólicos e expressão hipotalâmica e adipocítica de CB1 em ratos Wistar jovens.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a indução da obesidade precoce por superalimentação pós-natal;
- Avaliar, em ratos de 21 e 60 dias, os efeitos da obesidade e do dimorfismo sexual sobre:
 - A ingestão alimentar, hídrica e o ganho de massa corporal;
 - A massa relativa de tecidos relacionados à função endócrina e metabólica: adrenal, hipófise, tecido adiposo marrom (TAM) e reservas perigonadal e retroperitoneal de tecido adiposo branco (TAB);
 - O perfil lipídico;
 - A glicemia em resposta ao teste de tolerância oral à glicose;
 - A expressão do receptor CB1 nos núcleos hipotalâmicos ARC e PVN;
 - A expressão de RNAm para o receptor CB1 no TAB retroperitoneal.

4 JUSTIFICATIVA

O aumento das doenças crônicas e a diminuição da qualidade de vida constituem duas das mais significativas consequências decorrentes da obesidade. Ao contrário do que ocorre com outros grandes desafios à saúde, como a desnutrição e o tabagismo, as taxas de obesidade não estão decaindo no mundo, revelando-se, assim, como um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade (WHO, 2017).

Evidências apontam para uma associação entre a obesidade e a disfunção do SEC central, particularmente no controle da ingestão alimentar, porém, a maioria dos estudos experimentais abordando o assunto analisam os efeitos do sobrepeso em longo prazo (animais adultos) e apenas no sexo masculino, evidenciando uma escassez de literatura a respeito do dimorfismo sexual e das diferentes janelas temporais nestas respostas adaptativas (FRANCISCHETTI, ABREU, 2006; GALLETTI, 2012).

Dentre os diversos modelos experimentais que reproduzem a obesidade, destaca-se o de superalimentação pós-natal por meio da redução do número de animais por ninhada. Este modelo tem se apresentado bastante útil nos estudos desta doença, uma vez que mimetizam os atuais cenários de transição demográfica e nutricional, nos quais os indivíduos estão tendo cada vez menos filhos e maior acesso à alimentação hipercalórica, permitindo assim uma análise mais realista do papel da dieta moderna na gênese da obesidade (TEIXEIRA, 2014; TRIGO, 2016).

Diante destes fatos, o presente estudo visa investigar as possíveis alterações decorrentes do desenvolvimento da obesidade e do dimorfismo sexual sobre parâmetros metabólicos, comportamentais e de expressão do receptor CB1 no SNC e no TAB de ratos jovens, de modo que os dados obtidos possam contribuir para o esclarecimento dos mecanismos causadores da obesidade e otimização de possíveis estratégias farmacológicas ou alternativas para manejo deste distúrbio.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos constantes neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL/MG (protocolo número 11/2018).

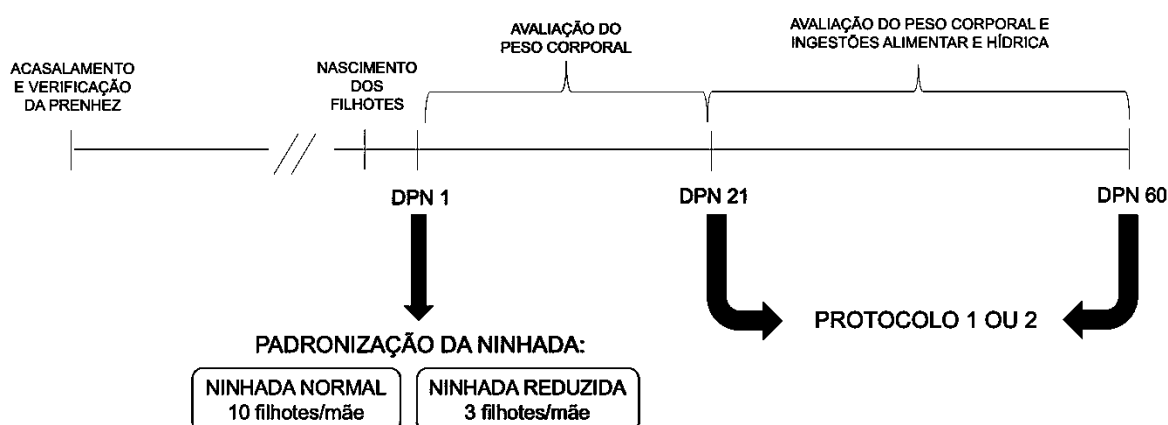
Foram utilizados 119 animais, dos quais 11 fêmeas Wistar adultas (8 semanas) advindas do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas e submetidas ao acasalamento heterogênico com machos experientes da mesma linhagem, enquanto os demais foram oriundos das proles geradas somente para fins de experimentação, conforme consta detalhado na tabela abaixo.

GRUPO 21 DIAS			
NINHADA NORMAL (NN)	Mães	Filhotes machos	Filhotes fêmeas
	3	5	5
Subtotal	3	15	15
NINHADA REDUZIDA (NR)	Mães	Filhotes machos	Filhotes fêmeas
	4	1	2
Subtotal	4	2	1
	8	12	12
GRUPO 60 DIAS			
NINHADA NORMAL (NN)	Mães	Filhotes machos	Filhotes fêmeas
	3	5	5
Subtotal	3	15	15
NINHADA REDUZIDA (NR)	Mães	Filhotes machos	Filhotes fêmeas
	4	1	2
Subtotal	4	2	1
	8	12	12
Total geral	11	54	54

Todos os animais foram alojados em caixas de polipropileno fechadas com tampa de aço inoxidável no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas/ICB/UNIFAL-MG, tendo livre acesso à ração comercial e água, temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h). Cada mãe foi utilizada para obtenção de 2 ninhadas, originando assim os grupos de animais avaliados aos 21 e 60 dias.

Foi realizado um ajuste no número de filhotes machos e fêmeas de cada ninhada no primeiro dia pós-parto, sendo as mães e suas proles divididas nos

seguintes grupos: ninhada normal (NN, 10 filhotes) e ninhada reduzida (NR, 3 filhotes). Os filhotes machos e fêmeas foram divididos em números iguais dentro de cada ninhada (5 de cada na ninhada NN e 1 fêmea/2 machos ou 2 fêmeas/1 macho na ninhada NR, de forma que o número final de cada sexo fosse idêntico). Os animais do primeiro grupo foram avaliados imediatamente após o desmame (21 dias de vida) e os do segundo grupo foram avaliados aos 60 dias de idade, conforme ilustrado abaixo.



O protocolo 1 consistiu na realização dos experimentos descritos nos itens 5.2, 5.3, 5.4 e 5.6 da presente metodologia, enquanto o protocolo 2 compreendeu experimentos relacionados aos itens 5.2 e 5.5.

Os filhotes excedentes foram aproveitados em experimento para obtenção de células para cultura primária de outro projeto realizado no laboratório, conforme protocolo previamente aprovado pelo CEUA UNIFAL/MG (protocolo número 585/2014).

5.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE PARÂMETROS DO DESENVOLVIMENTO

A verificação da instalação da obesidade foi realizada por meio da análise da massa corporal, da hipertrofia adipocítica e da taxa específica de ganho de peso.

A massa corporal da prole foi aferida a cada três dias a partir do primeiro dia pós-natal, sempre no período da manhã. Para os experimentos de avaliação da ingesta hídrica e alimentar, após o desmame (21º dia), fêmeas e machos foram

colocados em gaiolas metabólicas, passando a ter suas massas corporais, ingestas hídrica e calórica verificadas semanalmente também durante a manhã.

A avaliação da hipertrofia adipocítica foi feita pela determinação do peso relativo (gramas/100 gramas de peso corporal) das reservas de TAB retroperitoneal e perigonadal, servindo posteriormente como parâmetro para a decisão do tecido a ser escolhido para quantificação de RNAm para CB1.

A determinação da taxa específica de ganho de peso foi estimada pelo cálculo $TEGP = \frac{Mf - Mi}{Mi}$, onde Mf é a massa corporal no 21° ou 60° dia de vida e Mi é a massa no primeiro dia de análise (1° ou 21° dia de vida).

5.3 TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE (TTOG)

Ao final dos 21 ou 60 dias, os animais provenientes das proles NN e NR foram submetidos ao desafio do teste de tolerância oral à glicose (TTOG). Para tanto, eles receberam por gavagem uma solução de glicose a 50% (1,5g de glicose/kg de peso corporal) após jejum de 6 horas, o qual foi iniciado às 7h.

As amostras de sangue para avaliação da curva glicêmica foram obtidas imediatamente antes (tempo 0) e aos 30, 60 e 120 minutos após a gavagem, por meio de punção na cauda realizada com agulha 13 x 0,45 mm. Em seguida, o sangue foi analisado em tiras reagentes do monitor de glicose sanguínea G-Tech Free 1®, o qual forneceu os níveis de glicemia em mg/dL.

5.4 EXTRAÇÃO DE ÓRGÃOS E TECIDOS

Ao final dos 21 dias, os animais NN e NR foram eutanasiados por decapitação para coleta de sangue e outros órgãos e tecidos [hipófise, adrenal, tecido adiposo marrom – TAM e tecido adiposo branco (TAB) retroperitoneal e perigonadal]. Os órgãos e tecidos tiveram suas massas determinadas e corrigidas para 100 gramas de massa corporal do animal. O sangue total obtido do tronco foi coletado com heparina e centrifugado (3000 rpm/1600G por 20 minutos a 4°C) e o plasma foi separado para posterior determinação do perfil lipídico (triglicérides e colesterol total, por meio de kits enzimáticos colorimétricos Labtest Diagnóstica), enquanto o TABr

foi congelado para posterior extração do RNA. O mesmo procedimento foi feito com o grupo de 60 dias.

5.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Ao final dos 21 ou 60 dias, 4 fêmeas e 4 machos de cada grupo foram selecionados e, 2 horas após sobrecarga de glicose ou 6 horas de jejum, foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (60mg/kg) e xilazina (7,5mg/kg), sendo em seguida perfundidos por meio de punção intracardíaca com 150 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS, pH 7,4), seguido de 350 mL de solução de PBS contendo formaldeído a 4%. Os encéfalos foram removidos e mantidos imersos na solução fixadora por cerca de 4 horas em temperatura ambiente sob agitação, sendo, em seguida, transferidos para solução de sacarose a 30%, onde permaneceram durante aproximadamente 36 horas. Em sequência, os encéfalos foram seccionados no plano coronal em cortes de 30 μ m de espessura em micrótomo de congelamento. Os cortes coletados foram armazenados em solução anticongelante a -20°C até o processamento imunoistoquímico pela técnica de *free-floating*.

Os cortes foram tratados com boridreto de sódio 1% por 30 minutos, lavados e então incubados com soro normal de cavalo 10% em PBS (0,01M contendo Triton 0,1% e NaN₃ 0,04%) por no mínimo uma hora. Em seguida, foram lavados novamente com PBS 0,01M e incubados *overnight* com o anticorpo primário anti-CB1 (rabbit, 1:1000, Abcam). Após este período, os cortes foram mais uma vez lavados em PBS 0,01M e incubados com o anticorpo secundário fluorescente donkey-anti-rabbit (Alexa®594) por um período de 2 horas, seguido por lavagem. Os cortes foram montados sobre lâminas gelatinizadas e cobertos com o meio de montagem. Fotos representativas de cada condição experimental foram adquiridas no mesmo plano por meio de um sistema computadorizado de aquisição de imagens acoplado a um microscópio Nikon. A quantificação do sinal imunofluorescente foi realizada nos núcleos ARC (2,3 mm posterior ao bregma) e PVN (1,4 mm posterior ao bregma) utilizando-se o software Image J®.

5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAm DE CB1

As amostras de TAB foram homogeneizadas com tampão PBS 0,01M e misturadas com 750 μ L de TRIzol™ e 200 μ L de clorofórmio, sendo então centrifugadas por 25 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi aspirado, a ele foram adicionados 500 μ L de álcool isopropílico e, após agitação por inversão, os frascos foram armazenados *overnight* a -20° C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. Foi então adicionado a cada amostra o volume de 1 mL de álcool 70% e uma nova centrifugação foi feita por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente até que os pellets ficassem translúcidos e depois disso foi feita a adição de 15 μ L de água DEPC. Os frascos foram então colocados em estufa a 60° C por 10 minutos para a solubilização dos pellets e, em seguida, armazenados a -20° C. A quantificação do RNA total foi realizada a partir de 2 μ L de amostra no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt – UNIFAL-MG), no aparelho NanoDrop®. A partir da concentração de ácidos nucleicos obtida na quantificação, foi feita a diluição em água DEPC para a concentração de 100 ng/ μ L. A um volume de 5 μ L de RNA diluído (500 ng) foi adicionada a mistura de síntese de cDNA, sendo as amostras submetidas em seguida às condições padrão de termociclagem.

Por fim, um volume de 4 μ L de cDNA puro foi pipetado em duplicatas em placas de 96 poços. A este volume foram adicionados 8 μ L da mistura contendo as sondas para o gene de interesse (CB1) ou para um controle endógeno (Beta-actina). As placas foram levadas ao aparelho *real time PCR* e a fluorescência obtida durante os ciclos de amplificação foi quantificada, permitindo assim a avaliação da expressão de relativa de RNAm para o receptor CB1 pelo método do $\Delta\Delta$ Ct nas amostras de TAB.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram submetidos à análise por Análise de Variância de uma ou duas vias ou teste

t, dependendo do protocolo experimental, usando-se o programa Graphpad Prism® versão 7.0. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE SUPERALIMENTAÇÃO COM A REDUÇÃO DA NINHADA

Como demonstrado na figura 2A, houve diferença na evolução da massa corporal dos animais machos pertencentes ao grupo NR, quando comparados com os animais provenientes de mães NN [$F_{(1, 186)} = 41,62$; $p < 0,0001$]. O mesmo padrão de resposta foi observado para as fêmeas pertencentes ao grupo NR [$F_{(1, 198)} = 78,4$; $p < 0,0001$; Figura 2B]. Este efeito de aumento da massa corporal na NR apareceu mais precocemente nos filhotes machos, em torno do sétimo dia, em comparação às fêmeas, nas quais o efeito tornou-se significativo apenas no final da segunda semana de vida. Uma similaridade no peso dos machos NN e NR foi vista aos 25 e 31° dias de vida, seguida por um retorno ao padrão de maior ganho de peso dos animais NR, que perdurou até o final do experimento.

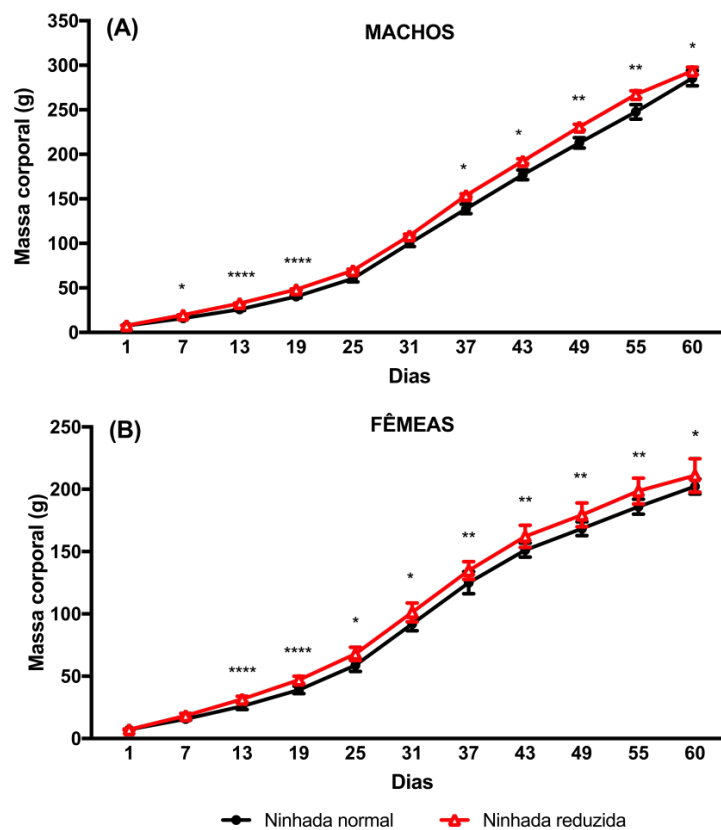


Figura 2 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a evolução da massa corporal de machos (A) e fêmeas (B) provenientes de ninhadas normais (linhas pretas) ou reduzidas (linhas vermelhas). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Fonte: da autora.

A ingestão alimentar foi avaliada semanalmente após o desmame e sofreu efeito do tamanho da ninhada [$F_{(3, 192)} = 99,49$; $p < 0,0001$; Figura 3], apresentando-se maior nas 5^ª e 6^ª semanas de vida dos machos NR, quando comparadas aos animais NN, enquanto as fêmeas exibiram um padrão normofágico ao longo do período analisado. A variável sexo, por sua vez, indicou um maior consumo de ração dos machos NR a partir da quinta semana e dos machos NN a partir da sexta semana quando comparado ao das fêmeas de seus respectivos grupos [$F_{(3, 192)} = 99,49$; $p < 0,0001$], revelando assim o maior consumo característico do sexo masculino no período pós-adolescência.

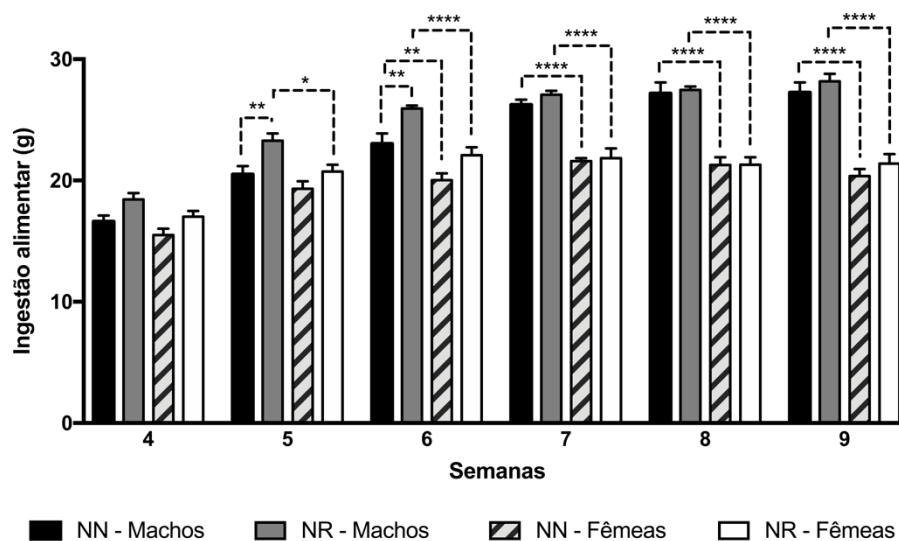


Figura 3 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a ingestão alimentar média semanal de machos e fêmeas provenientes de ninhadas normais (NN) ou reduzidas (NR). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Fonte: da autora.

Conforme evidenciado na Figura 4, a ingestão hídrica, também avaliada semanalmente, não se mostrou estatisticamente diferente entre os grupos estudados, tanto em machos [$F_{(1, 96)} = 3,501$] quanto em fêmeas [$F_{(1, 96)} = 0,1448$], em nenhum dos tempos avaliados.

No que diz respeito ao dimorfismo sexual, machos NR tiveram maior consumo hídrico a partir da sétima semana, enquanto machos NN apresentaram maior consumo apenas na nona semana [$F_{(3, 192)} = 19,79$; $p < 0,0001$].

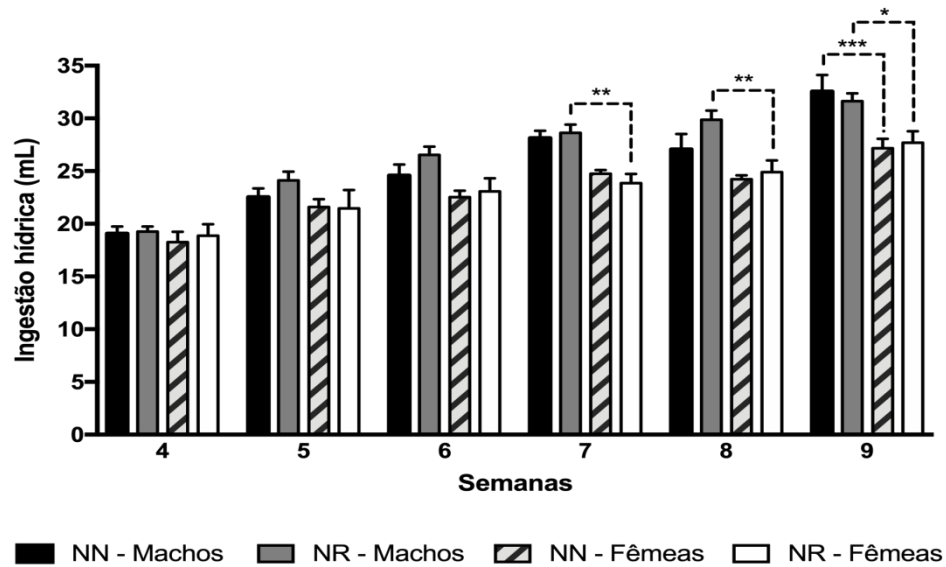


Figura 4 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a ingestão hídrica média semanal de machos e fêmeas provenientes de ninhadas normais (NN) ou reduzidas (NR). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: da autora.

A taxa específica de ganho de peso (TEGP) mostrou-se maior nos animais pertencentes ao grupo NR em ambos os sexos aos 21 dias [$F_{(1, 60)} = 85,09$; $p < 0,0001$], menor aos 35 dias também em ambos os sexos [$F_{(1, 45)} = 43,74$; $p < 0,0001$] e menor em machos NR aos 60 dias [$F_{(1, 43)} = 14,89$; $p < 0,001$]. Por outro lado, as comparações entre a TEGP de machos e fêmeas obesos não detectaram diferenças devido ao sexo aos 21 dias [$F_{(1, 60)} = 0,0591$], mas estas foram significativas aos 35 [$F_{(1, 45)} = 6,28$; $p < 0,01$] e 60 dias [$F_{(1, 43)} = 96,42$; $p < 0,0001$; Figura 5].

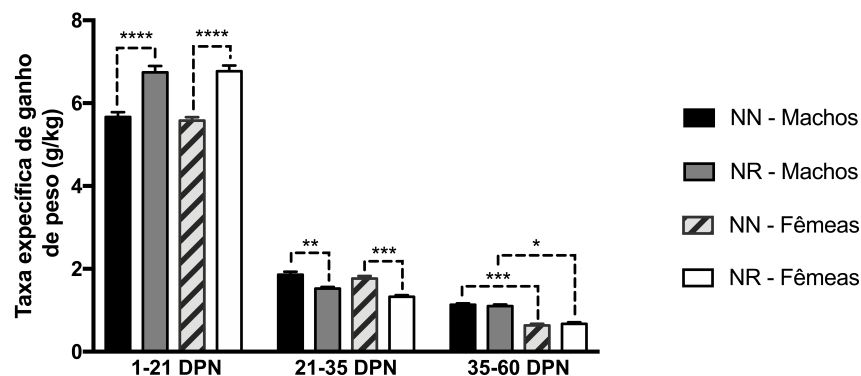


Figura 5 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a taxa específica de ganho de peso em animais de 21 e 60 dias provenientes de ninhadas normais (NN) ou reduzidas (NR). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. DPN: dia pós-natal.

Fonte: da autora.

Foi também observado efeito do sobrepeso [$F_{(1, 52)} = 49,85$; $p < 0,0001$] e do dimorfismo sexual [$F_{(1, 52)} = 9,363$; $p < 0,01$] sobre o TAB perigonadal aos 21 dias, evidenciado pelo aumento significativo na massa relativa desse tecido em animais de ambos os sexos provenientes de NRs, e da maior massa de TABp das fêmeas NN quando comparadas aos machos do mesmo grupo (Figura 6A).

Em relação ao grupo de 60 dias, a variável tratamento não gerou alterações estatísticas [$F_{(1, 29)} = 3,268$], uma vez que os machos NR não apresentaram alterações quando comparados ao grupo NN. Já o TABp das fêmeas mostrou-se maior nos animais pertencentes ao grupo NR. A variável sexo, por sua vez, teve efeito significativo sobre a massa do TABp [$F_{(1, 29)} = 47,85$; $p < 0,0001$], sendo maior nas fêmeas de ambos os tratamentos (Figura 6A).

A reserva retroperitoneal de TAB mostrou-se significativamente maior tanto em machos quanto em fêmeas do grupo NR de 21 dias, revelando assim o efeito positivo da redução da ninhada sobre esse parâmetro [$F_{(1, 37)} = 19,21$; $p < 0,0001$; Figura 6B]. A diferença de sexo, por outro lado, não afetou massa desse tecido [$F_{(1, 37)} = 0,2885$].

No que diz respeito aos animais de 60 dias, ambos os sexos do grupo NR também apresentaram valores médios de TABr maiores que os dos grupos NN [$F_{(1, 26)} = 12,04$; $p < 0,002$]. Houve também efeito do sexo sobre esse parâmetro [$F_{(1, 26)} = 5,131$; $p < 0,05$].

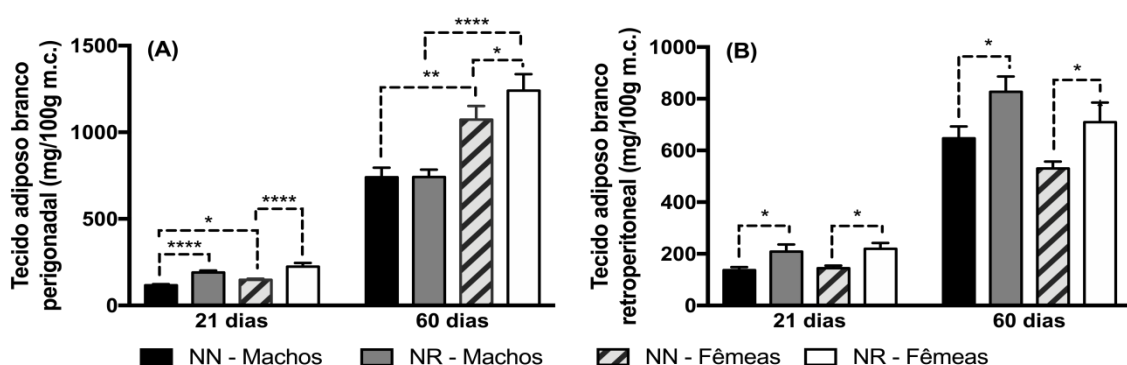


Figura 6 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a massa relativa dos depósitos perigonadal (A) e retroperitoneal (B) de tecido adiposo branco em animais de 21 e 60 dias provenientes de ninhadas normais (NN) ou reduzidas (NR). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Fonte: da autora.

6.2 EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE A MASSA RELATIVA DE TECIDOS

Conforme evidenciado na Figura 7A, a massa relativa da hipófise não apresentou variações aos 21 dias [$F_{(1, 51)} = 1,703$], tampouco aos 60 dias [$F_{(1, 32)} = 0,1767$]. O dimorfismo sexual, por sua vez, resultou em uma maior massa da hipófise das fêmeas NN aos 21 dias [$F_{(1, 51)} = 7,199$; $p < 0,01$] e de fêmeas NN e NR aos 60 dias [$F_{(1, 32)} = 83,4$; $p < 0,0001$], quando comparadas aos machos de seus respectivos grupos.

Ademais, não foram encontradas diferenças estatísticas advindas da redução da ninhada [$F_{(1, 40)} = 1,534$] e dimorfismo sexual [$F_{(1, 40)} = 3,887$] sobre a massa relativa da adrenal de nenhum dos grupos estudados aos 21 dias, tampouco houve efeito do tratamento aos 60 dias [$F_{(1, 32)} = 0,08456$]. Por outro lado, o dimorfismo sexual teve efeito sobre a adrenal de ambos os grupos aos 60 dias [$F_{(1, 32)} = 34,63$; $p < 0,0001$, Figura 7B].

Verificou-se também aumento da massa relativa do TAM nos animais NR de ambos os sexos aos 21 dias de vida [$F_{(1, 51)} = 19,47$; $p < 0,0001$; Figura 7C], mas nenhuma alteração devido ao sexo [$F_{(1, 51)} = 3,174$]. O TAM dos animais adultos (60 dias), por sua vez, não se mostrou estatisticamente diferente devido ao tratamento [$F_{(1, 29)} = 3,869$], mas mostrou-se aumentado nas fêmeas NN, indicando efeito do sexo sobre esse parâmetro [$F_{(1, 29)} = 14,31$; $p < 0,001$].

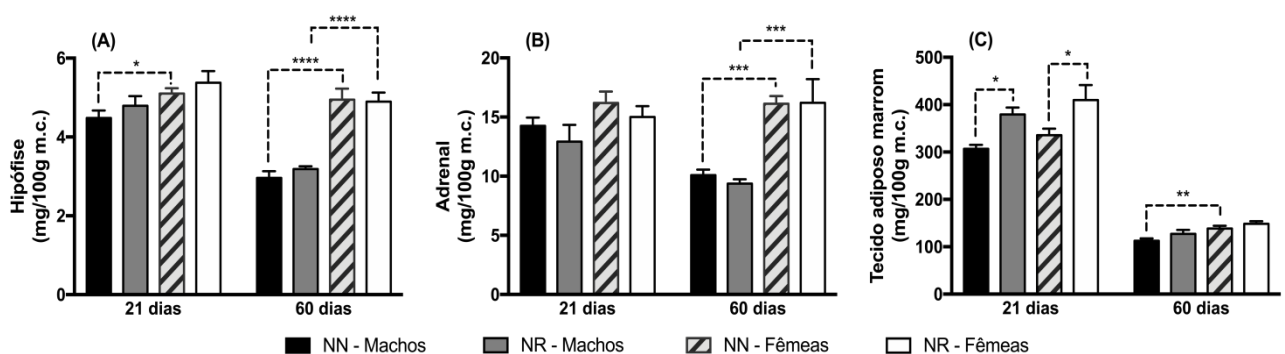


Figura 7 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a massa da hipófise (A), adrenal (B) e tecido adiposo marron (C) em animais de 21 e 60 dias provenientes de ninhadas normais (NN) ou reduzidas (NR). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fonte: da autora.

6.3 EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE O PERFIL LIPÍDICO

Como demonstrado no item A da figura abaixo, tanto fêmeas quanto machos provenientes do grupo NR de 21 dias apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de colesterol total [$F_{(1, 32)} = 27,17$; $p < 0,0001$]. Também foi visto efeito do tamanho da ninhada no grupo de 60 dias [$F_{(1, 31)} = 4,472$; $p < 0,05$], no qual este parâmetro mostrou redução nos machos NR de 60 dias, sem alterações significativas nas fêmeas NR de mesma idade. Por outro lado, não foram identificadas alterações devido ao dimorfismo sexual aos 21 dias [$F_{(1, 32)} = 1,348$], tampouco aos 60 dias [$F_{(1, 31)} = 0,2183$].

Ademais, não foi observado efeito da obesidade [$F_{(1, 31)} = 1,415$] ou do sexo [$F_{(1, 31)} = 2,622$] sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídeos nos filhotes de 21 dias (Figura 8B). Em contrapartida, ambos os sexos de ninhadas NR apresentaram aumento nos níveis de triglicerídeos aos 60 dias quando comparados às NN [$F_{(1, 31)} = 34,61$; $p < 0,0001$], e as concentrações de triglicerídeos dos machos de ambos os grupos se revelaram superiores às das fêmeas [$F_{(1, 31)} = 45,6$; $p < 0,0001$].

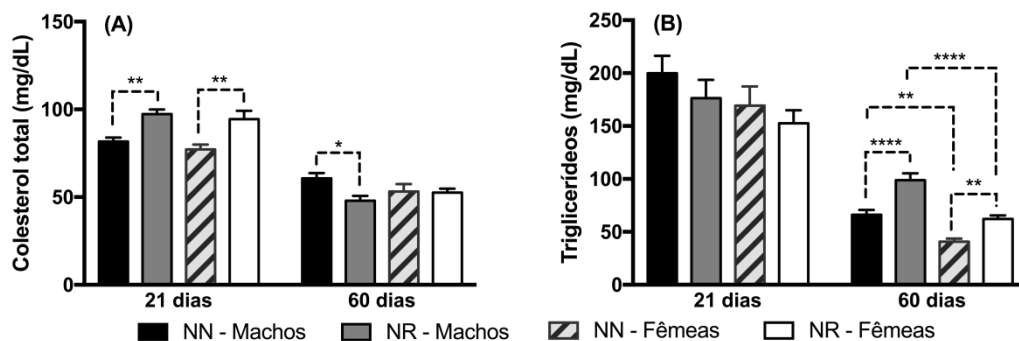


Figura 8 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre as concentrações plasmáticas de colesterol total (A) e triglicerídeos (B) em animais de 21 e 60 dias provenientes de ninhadas normais (NN) ou reduzidas (NR). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Fonte: da autora.

6.4 EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE O PERFIL GLICÊMICO

Como demonstrado na próxima figura, os machos de 21 dias pertencentes ao grupo submetido ao protocolo NR apresentaram níveis glicêmicos superiores aos dos animais NN, característica que perdurou durante todo o teste de tolerância oral à glicose [$F_{(1, 58)} = 21,66$; $p < 0,0001$; Figura 9A]. As fêmeas de 21 dias, por sua vez, não apresentaram diferença na glicemia nos tempos estudados [$F_{(1, 63)} = 0,6205$; Figura 9B]. No que diz respeito ao efeito do dimorfismo sexual, foram vistas maiores concentrações de glicose sanguínea nos tempos 0 e 1h dos machos do grupo NR [$F_{(1, 57)} = 19,12$; $p < 0,0001$], enquanto nenhuma diferença devido ao sexo foi notada nos animais NN de 21 dias [$F_{(1, 64)} = 0,4654$].

O perfil glicêmico dos machos NR de 60 dias, assim como o das fêmeas advindas deste mesmo grupo, apresentou-se semelhante ao dos animais NN nos tempos 0, 60 e 120 minutos. Aos 30 minutos, porém, ambos machos [$F_{(1, 61)} = 5,844$; $p < 0,02$] e fêmeas [$F_{(1, 64)} = 8,223$; $p < 0,01$] NR apresentaram elevação da glicemia em relação ao grupo controle (Figuras 9C e 9D). As comparações entre sexos dentro do mesmo tipo de tratamento não foram significativas nos animais NN [$F_{(1, 63)} = 0,7952$], tampouco nos NR [$F_{(1, 62)} = 0,0145$].

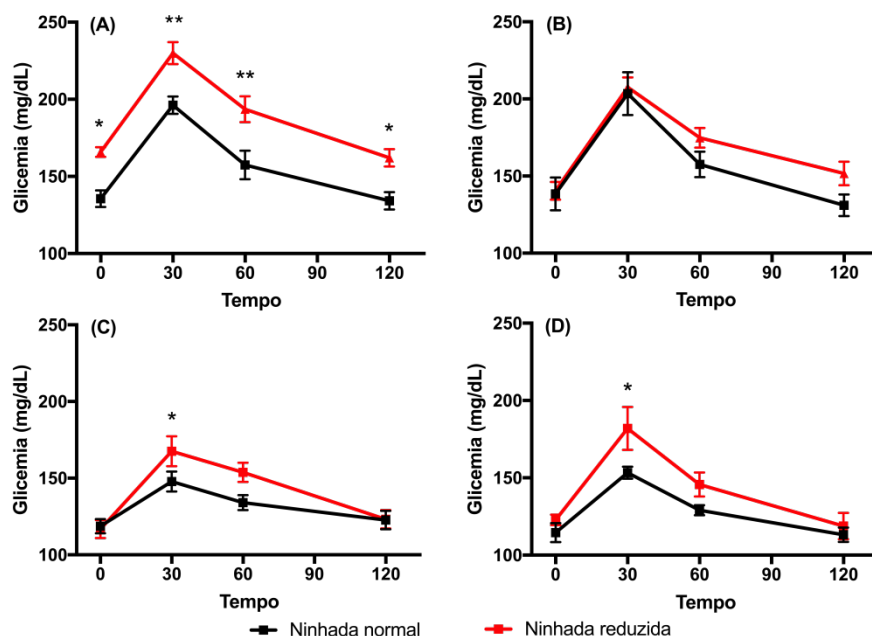


Figura 9 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a glicemia em resposta ao teste de tolerância oral à glicose em machos (A) e fêmeas (B) de 21 dias e machos (C) e fêmeas (D) de 60 dias provenientes de ninhadas normais (linhas pretas) ou reduzidas (linhas vermelhas). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fonte: da autora.

Por fim, houve também efeito do tamanho da ninhada sobre a área sob a curva tanto aos 21 [$F_{(1, 24)} = 14,81$; $p < 0,001$] quanto aos 60 dias [$F_{(1, 31)} = 9,43$; $p < 0,01$], o qual foi evidenciado pelo aumento da AUC dos machos NR em ambos os períodos analisados, e das fêmeas NR de 60 dias (Figura 10). A variável sexo, por sua vez, não gerou alteração significativa em nenhum dos tempos estudados {[$F_{(1, 24)} = 2,758$] e [$F_{(1, 31)} = 0,0872$]}

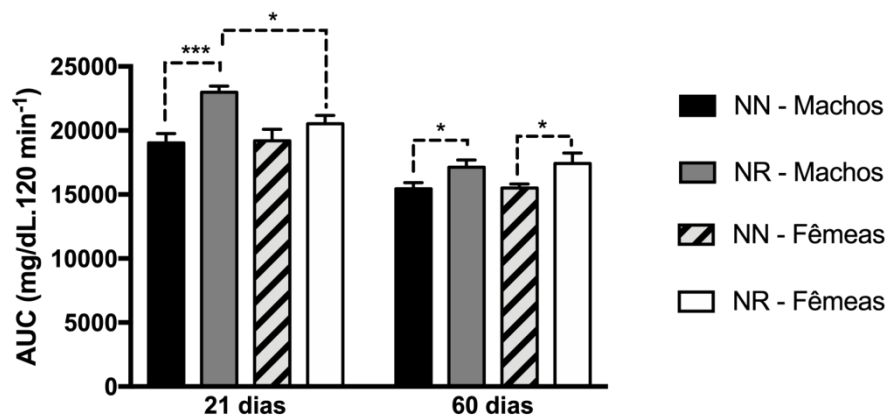


Figura 10 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a área sob a curva de machos e fêmeas de 21 e 60 dias provenientes de ninhadas normais (NN) ou reduzidas (NR). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Fonte: da autora.

6.5 EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE A EXPRESSÃO DO RECEPTOR CB1 NOS NÚCLEOS ARC E PVN

Como demonstrado nas figuras 11A e 12, a expressão do receptor CB1 no ARC de animais de 21 dias sofreu efeito tanto do dimorfismo sexual [$F_{(1, 10)} = 8,762$; $p < 0,05$] quanto do tamanho da ninhada [$F_{(3, 10)} = 71,63$; $p < 0,0001$]. Machos NR com sobrecarga de glicose tiveram uma expressão maior que a dos machos NN e, quando comparados às fêmeas do mesmo grupo, também demonstraram um valor mais alto na marcação de CB1.

O padrão alimentar pré-teste foi decisivo para as diferenças identificadas na área de marcação, uma vez que todos os grupos submetidos ao jejum, independentemente do sexo ou ninhada, apresentaram uma expressão superior à dos grupos que receberam sobrecarga de glicose.

Nos animais de 60 dias também foi visto efeito do sexo [$F_{(1, 23)} = 9,709$; $p < 0,01$] e do tratamento [$F_{(3, 23)} = 73,28$; $p < 0,0001$]. Além de identificarmos uma menor expressão de CB1 no ARC de fêmeas NR jejum quando comparadas às NN jejum, vimos também uma maior marcação nas fêmeas NN submetidas ao jejum quando comparadas aos machos pertencentes a esse mesmo grupo (Figuras 11B e 13).

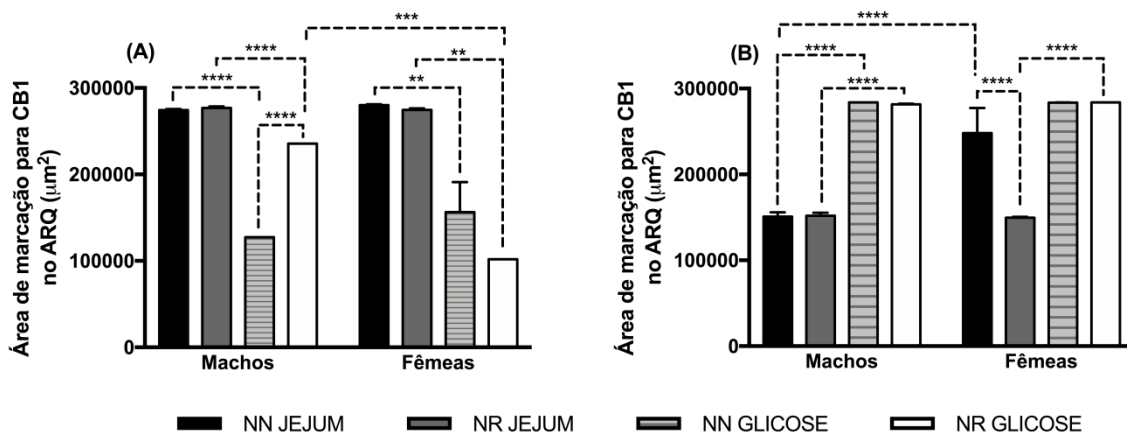


Figura 11 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a expressão do receptor CB1 no núcleo arqueado de machos e fêmeas de 21 (A) e 60 dias (B) dias provenientes de ninhadas normais (NN) ou reduzidas (NR). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fonte: da autora.

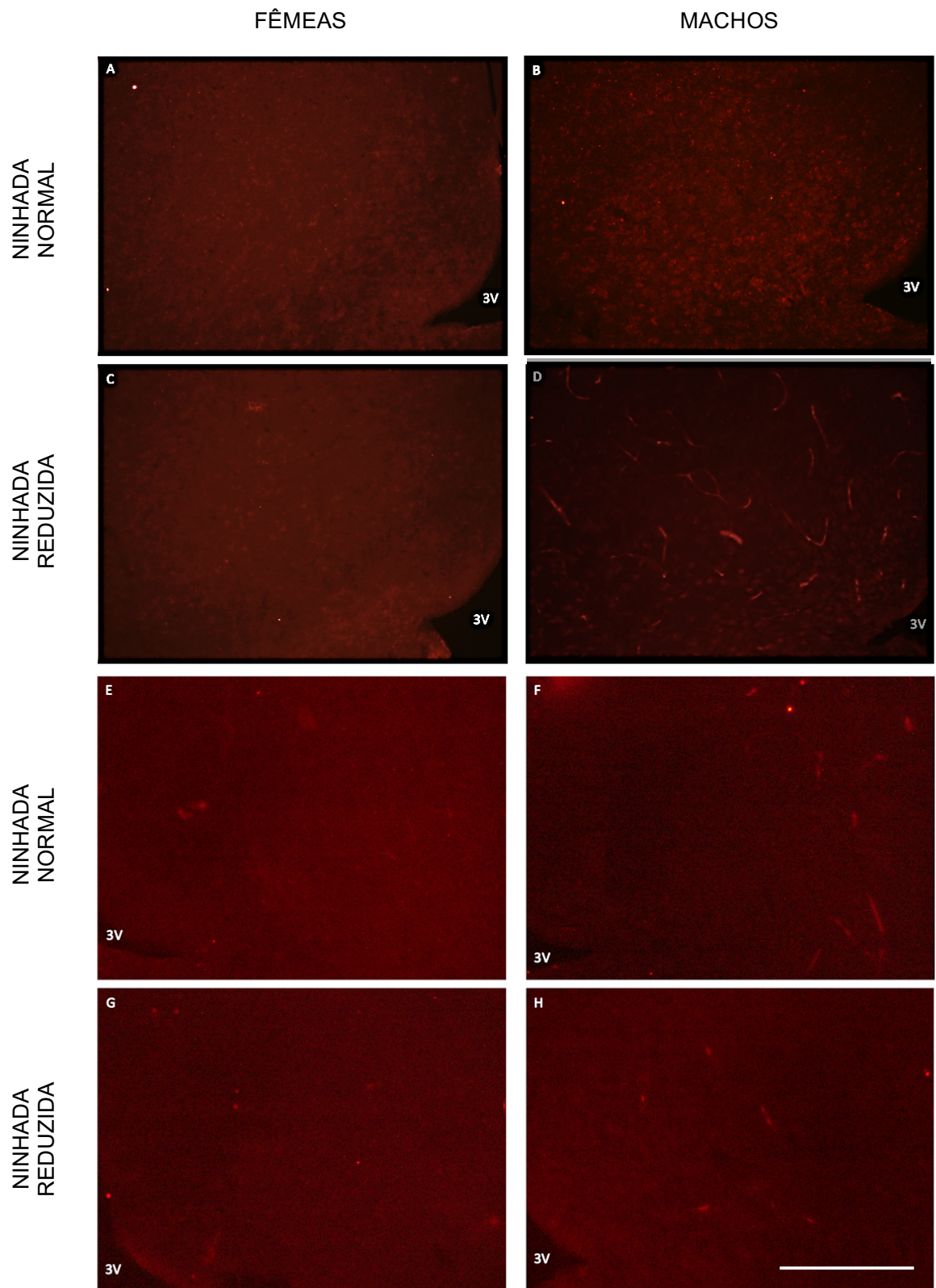


Figura 12 – Fotomicrografias representativas do núcleo arqueado (ARC) de machos (esquerda) e fêmeas (direita) de 21 dias de ninhadas normais ou submetidos ao protocolo de redução de ninhada mostrando a marcação fluorescente para CB1 (vermelho) após sobrecarga de glicose (A, B, C e D) ou jejum (E, F, G e H). Escala: 100 μ m. 3V: terceiro ventrículo.

Fonte: da autora.

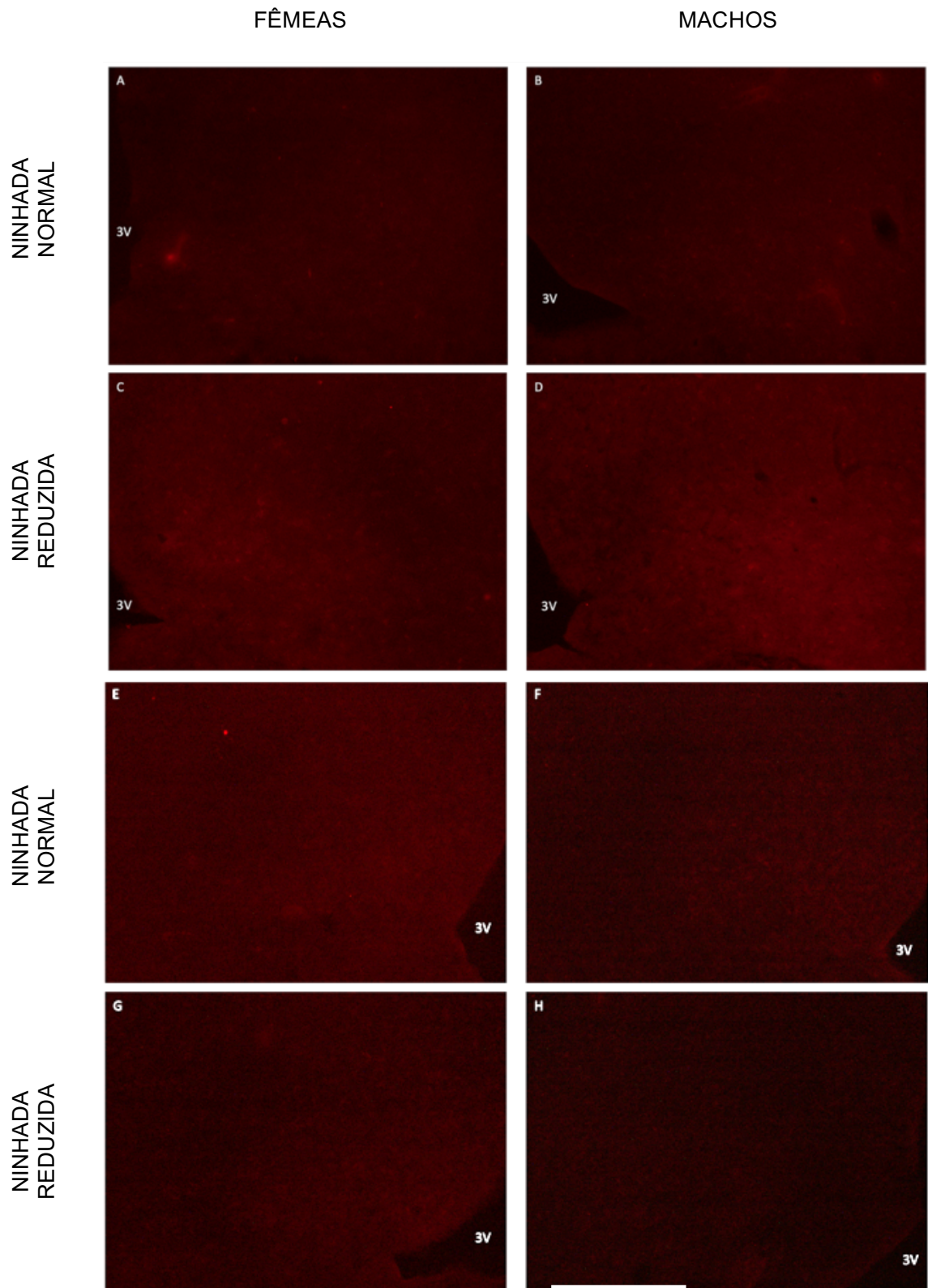


Figura 13 – Fotomicrografias representativas do núcleo arqueado (ARC) de machos (esquerda) e fêmeas (direita) de 60 dias de ninhadas normais ou submetidos ao protocolo de redução de ninhada mostrando a marcação fluorescente para CB1 (vermelho) após sobrecarga de glicose (A, B, C e D) ou jejum (E, F, G e H). Escala: 100 μ m. 3V: terceiro ventrículo.

Fonte: da autora.

No que diz respeito a expressão do receptor CB1 no PVN nos animais de 21 dias, foi observado efeito significativo do dimorfismo sexual [$F_{(1, 10)} = 80,54$; $p < 0,0001$; Figura 14A], como a menor marcação em fêmeas NR com sobrecarga de glicose, em relação aos machos do mesmo grupo, e também do tamanho da ninhada [$F_{(3, 10)} = 126,3$; $p < 0,0001$], o qual gerou menor expressão nas fêmeas com glicose, quando comparadas às fêmeas NN submetidas a mesma alimentação.

O padrão calórico pré-teste, mais uma vez, mostrou-se relevante para a área de marcação do receptor, uma vez que animais submetidos ao jejum apresentaram valores superiores aos animais que receberam glicose, evidenciando, assim, o papel orexígeno do SEC.

No grupo de jovens adultos (60 dias), não foram observadas alterações significativas devido a variações de sexo [$F_{(1, 24)} = 0,02193$], apenas devido ao tratamento recebido [$F_{(3, 24)} = 15,55$; $p < 0,0001$; Figura 14B].

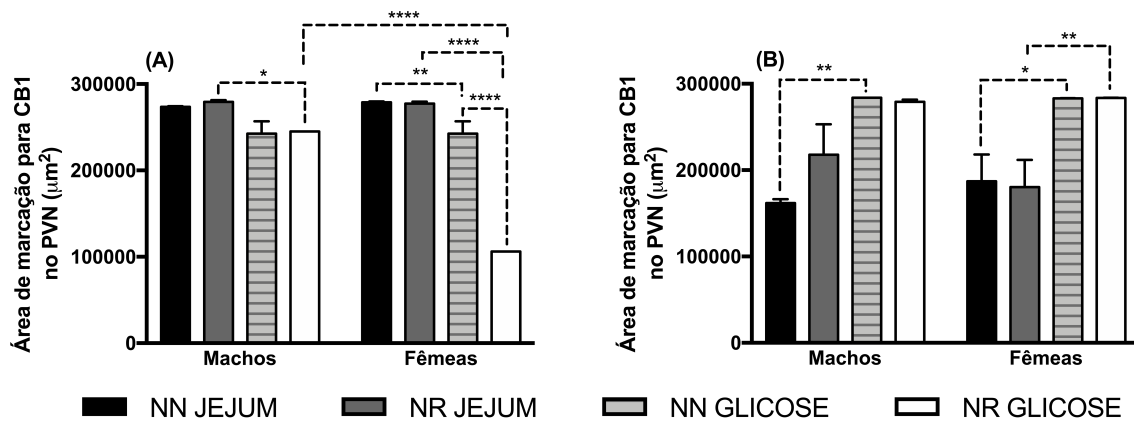


Figura 14 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a expressão do receptor CB1 no núcleo paraventricular de machos e fêmeas de 21 (A) e 60 dias (B) dias provenientes de ninhadas normais (NN) ou reduzidas (NR). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Fonte: da autora.

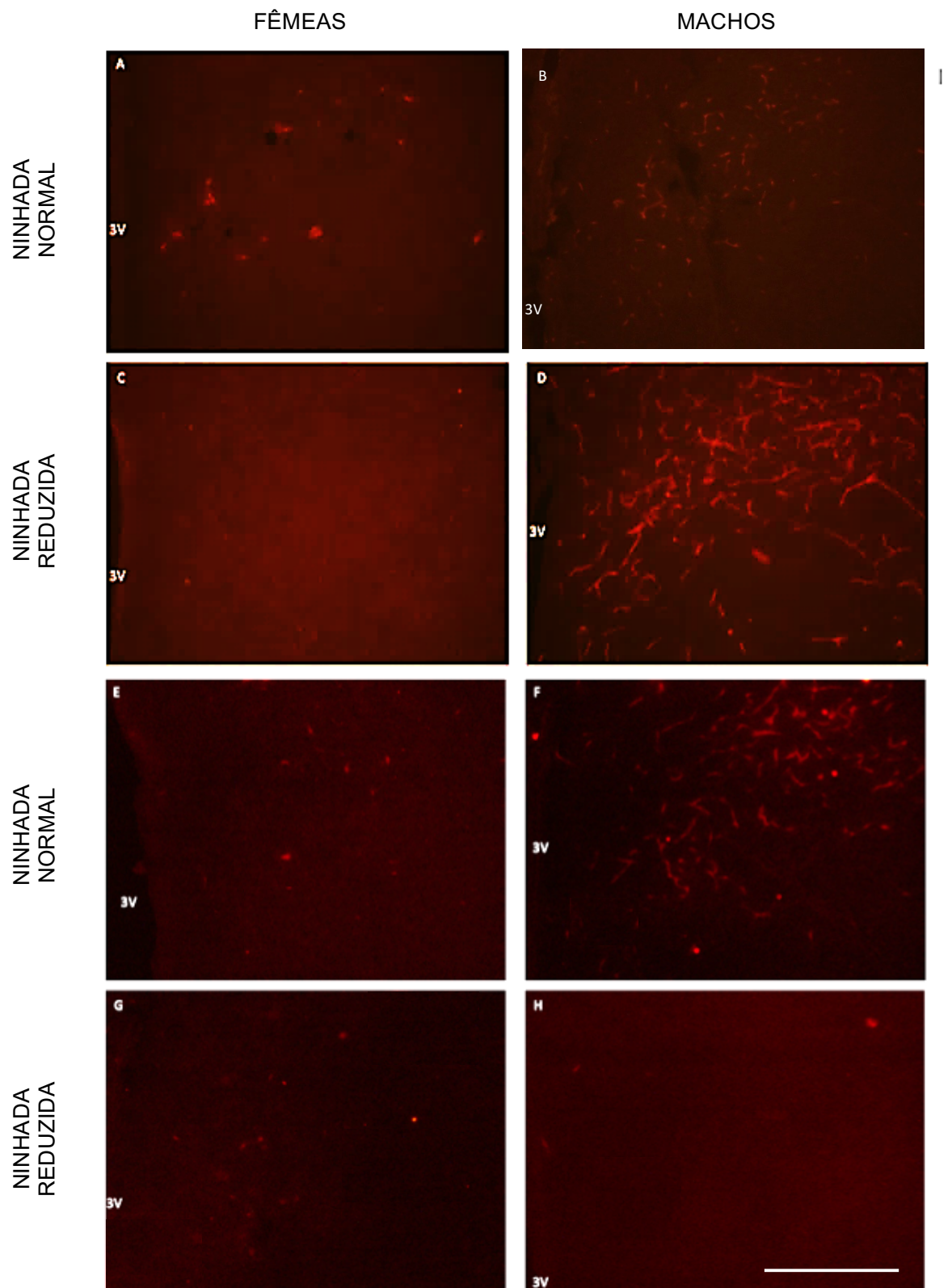


Figura 15 – Fotomicrografias representativas do núcleo paraventricular (PVN) de machos (esquerda) e fêmeas (direita) de 21 dias de ninhadas normais ou submetidos ao protocolo de redução de ninhada mostrando a marcação fluorescente para CB1 (vermelho) após sobrecarga de glicose (A, B, C e D) ou jejum (E, F, G e H). Escala: 100 μ m. 3V: terceiro ventrículo.

Fonte: da autora.

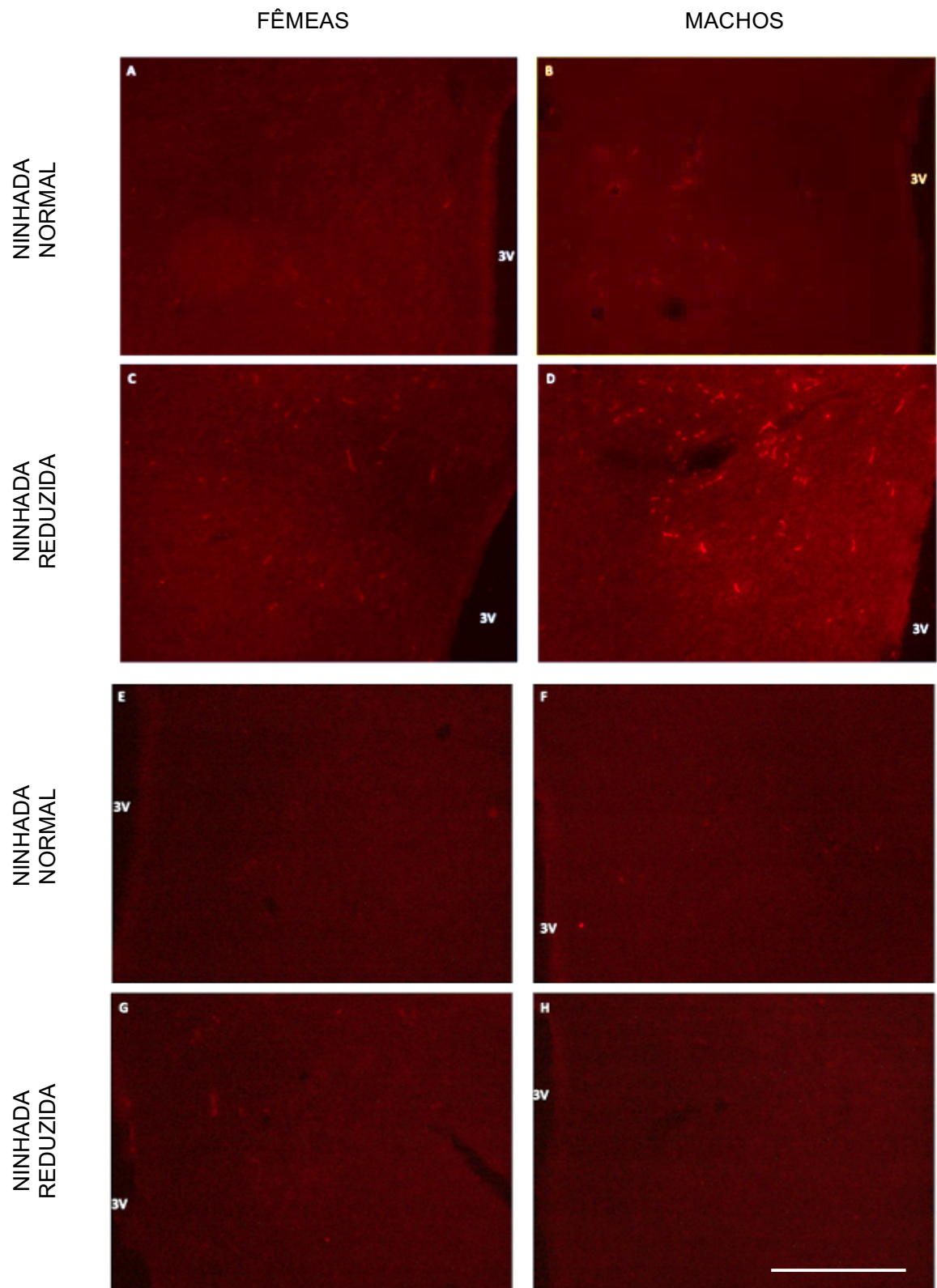


Figura 16 – Fotomicrografias representativas do núcleo paraventricular (PVN) de machos (esquerda) e fêmeas (direita) de 60 dias de ninhadas normais ou submetidos ao protocolo de redução de ninhada mostrando a marcação fluorescente para CB1 (vermelho) após sobrecarga de glicose (A, B, C e D) ou jejum (E, F, G e H). Escala: 100 μ m. 3V: terceiro ventrículo.

Fonte: da autora.

6.6 EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE A EXPRESSÃO DO RNAm PARA CB1 NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO

Por fim, no que diz respeito à expressão relativa de RNA mensageiro para CB1 no TABr aos 21 dias, vimos uma menor expressão tanto em machos, quanto em fêmeas NR, demonstrando assim o efeito do tamanho da ninhada sobre esse parâmetro [$F_{(1, 14)} = 47,98$; $p < 0,0001$; Figura 17]. A variável dimorfismo sexual, por sua vez, não gerou alterações significativas [$F_{(1, 14)} = 0,0003876$].

Nos animais de 60 dias observamos um aumento apenas nas fêmeas NR, as quais apresentaram valores de RNAm significativamente maiores que os vistos nas fêmeas NN e nos machos NR, indicando assim a interferência do tratamento [$F_{(1,14)} = 22,49$ $p < 0,0003$] e do sexo [$F_{(1,14)} = 19,54$; $p < 0,0006$] sobre o parâmetro analisado.

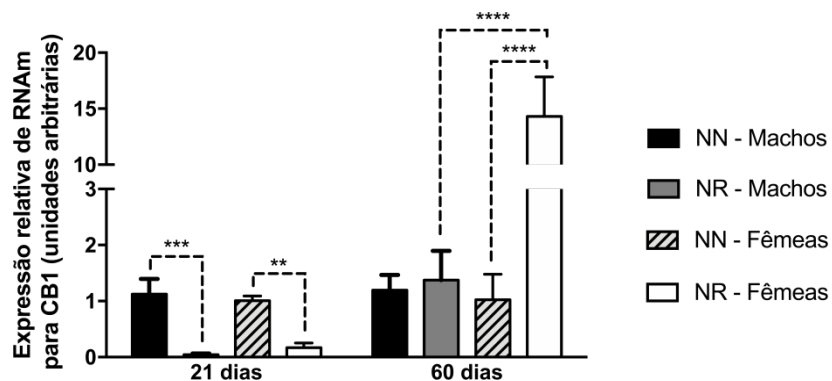


Figura 17 – Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre a expressão de RNAm do receptor CB1 no tecido adiposo branco de machos e fêmeas de 21 e 60 dias provenientes de ninhadas normais (NN) ou reduzidas (NR). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fonte: da autora.

7 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que o modelo experimental de ninhada reduzida foi eficaz em induzir a obesidade em ratos jovens de ambos os sexos, apresentando, inclusive, aspectos que caracterizam a síndrome metabólica. Assim, a evolução da massa corporal e o aumento dos depósitos de TAB evidenciam o importante efeito da programação neonatal relacionada à superalimentação em induzir alterações metabólicas importantes, manifestadas, neste estudo, também pelo aumento dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e glicemia e alterações na expressão do receptor CB1.

Inicialmente, observou-se que os animais do grupo NR apresentaram um aumento na massa corporal a partir do sétimo (machos) ou décimo dia de vida (fêmeas), o qual perdurou até o final do experimento. Esses dados corroboram os resultados obtidos em outros estudos que utilizaram o mesmo modelo para indução da obesidade, evidenciando diferença no ganho de peso a partir do 6° (TRIGO, 2016), 7° (STEFANIDIS, SPENCER, 2012; ZIKO et al, 2014), 8° (ENES-MARQUES, 2014) e 9° dia (ENES-MARQUES, GIUSTI-PAIVA, 2018) de lactação, efeito este que se manteve após o desmame.

A ausência de significância na comparação entre massas corporais de machos nas terceira e quarta semanas de vidas pode ser entendida como consequência da puberdade, período no qual o efeito anabólico gerado pelo aumento nos níveis de testosterona resulta em uma maior demanda metabólica nesses animais (STANBENFELD, EDQVIST, 1996). Analisando-se os resultados dos grupos de 60 dias, vemos que o ganho de peso dos ratos pertencentes ao grupo NR conservou-se superior ao encontrado nos animais advindos de ninhadas maiores após o período de aleitamento, dados que também se encontram em conformidade com os relatados por outros autores em protocolos semelhantes (RODRIGUES et al, 2009; STEFANIDIS, SPENCER, 2012; ENES-MARQUES, 2014; ZIKO et al, 2014), indicando a conservação do fenótipo de obesidade durante os períodos de juventude e fase adulta.

A fim de se melhor avaliar os efeitos da redução da ninhada, realizou-se a análise da taxa específica de ganho de peso (TEGP) dos animais aos 21 dias de vida, a qual apresentou um aumento de aproximadamente 20% em ambos os sexos dos grupos NR durante o período avaliado. Adicionalmente, avaliou-se diretamente

os estoques corporais de gordura branca visceral por meio da pesagem das reservas perigonadal e retroperitoneal de TAB, as quais mostraram-se significativamente maiores nos animais NR. A elevação na TEGP também foi relatada por outros autores neste mesmo modelo (NERY et al, 2011; ESTRELA, 2015), assim como o aumento nos depósitos de gordura (STEFANIDIS, SPENCER, 2012; MOZES, SEFCÍKOVÁ, RACEK, 2013; RIBEIRO, 2016), evidenciando uma correlação positiva entre a referida taxa e as reservas de gordura branca corporais. Assim, acredita-se que a TEGP possa oferecer uma boa estimativa da gordura corporal e caracterização da obesidade em roedores recém desmamados.

Nesse sentido, sabe-se que o sobrepeso, sobretudo devido ao aumento da gordura visceral, está associado a um risco significativamente maior para o surgimento da síndrome metabólica (SM), termo utilizado para classificar indivíduos com maior probabilidade de desenvolver doenças cardiovasculares (FERREIRA, 2016; FALUDI et al, 2017). Outros critérios utilizados para caracterização da SM são a presença de dislipidemia e hiperglicemia, as quais foram evidenciadas em nosso estudo pelo aumento nos níveis plasmáticos de colesterol total no desmame e de triglicerídeos aos 60 dias, e pela resistência às ações da insulina, manifestada nas respostas glicêmicas alteradas ao TTOG, resultados semelhantes aos obtidos por outros autores (RINALDI et al, 2012; ENES-MARQUES, GIUSTI-PAIVA, 2018). Uma das possíveis causas dessas hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia seria a maior disponibilidade de alimento quando comparada com animais de ninhadas maiores (KUMARESAN, ANDERSON, TURNER, 1967), assim como a qualidade desse alimento. Fiorotto e colaboradores (1991) relataram que as progenitoras NR, embora tivessem uma produção menor por filhote, geravam leite com maior conteúdo de gordura que mães de ninhadas médias e grandes. Sendo a gordura o principal componente calórico do leite, esses fatores poderiam estar contribuindo para a geração de um balanço energético positivo, com consequente aumento dos depósitos de tecido adiposo e ganho de peso na prole oriunda de ninhadas reduzidas.

A elevada ingestão de lipídeos advindos do aleitamento materno levaria à absorção desses ácidos graxos de cadeia longa e consequente esterificação a triglicérides, os quais são transportados na corrente sanguínea nos quilomícrons. Posteriormente, esses triglicerídeos podem ser hidrolisados pela enzima lipoproteína lipase, resultando em liberação de ácidos graxos para os tecidos, onde podem ser

metabolizados para geração de energia ou armazenados na forma de gordura nos adipócitos, para posterior liberação em caso de demanda (SANTOS et al, 2013). Interessantemente, observamos em nosso estudo uma tendência à diminuição nos níveis plasmáticos de triglicerídeos no grupo NR de 21 dias, efeito este que está em desacordo ao reportado anteriormente na literatura para este modelo (RINALDI et al, 2012; ENES-MARQUES, 2014; ENES-MARQUES, GIUSTI-PAIVA, 2018). Vale ressaltar que, em nosso estudo, a coleta de sangue dos filhotes foi feita de maneira casual e não após jejum, como na grande maioria dos estudos relatados. Nesse sentido, sabe-se que, em resposta ao jejum, ocorre aumento da lipólise no TAB e conseqüente aumento na concentração plasmática de ácidos graxos. Ademais, os ácidos graxos são essenciais para o funcionamento das proteínas desacopladoras (*uncoupling protein* – UCPs), expressas pelo TAM e, como os filhotes NR apresentaram aumento na massa deste tecido, levantamos a hipótese de que parte dos triglicerídeos circulantes tenha sido captada para manutenção do desacoplamento mitocondrial (BIANCO, 2000).

Além da própria oferta de alimento, outros fatores envolvidos no aumento da ingestão calórica seriam a imaturidade do mecanismo responsável pelo seu controle central em animais jovens (McMILLEN, ADAM, BEVERLY, 2005), a hipotrofia do VMH, com conseqüente diminuição da resposta a estímulos inibidores do apetite (RINALDI et al, 2012), e o desenvolvimento de resistência a sinalizadores de saciedade, como leptina e insulina (GOMES et al, 2012), alterações estas já descritas nos filhotes NR.

O sistema neural regulador do apetite envolve uma variada gama de componentes, incluindo neuromoduladores orexígenos (NPY e *agouti-related protein* – AgRP) e anorexígenos (POMC e CART), os quais agem como mediadores cruciais no gerenciamento do consumo e gasto energético em diferentes regiões hipotalâmicas, como na LHA e nos núcleos VMH, PVN e ARC (GROVE, SMITH, 2003; McMILLEN, ADAM, BEVERLY, 2005). Em roedores, o desenvolvimento do controle hipotalâmico regulatório do apetite ocorre predominantemente no período pós-natal, sendo que projeções de neurônios NPY/AgRP do ARC para o PVN e a LHA só se encontram completamente formadas após a segunda semana da vida (KAGOTANI et al, 1989; GROVE, SMITH, 2003; BYERLY et al, 2013).

Além disso, os neurônios dos núcleos hipotalâmicos expressam receptores para diversos estímulos periféricos, incluindo glicose, insulina, grelina e leptina.

Estudos indicam que níveis elevados de leptina circulante provocam aumento na expressão de POMC no ARC (SCHWARTZ, 2001; JORDAN, KONNER, BRUNING, 2010), resultando assim em supressão da ingestão alimentar e estímulo a um maior gasto energético. Por ser o TAB a fonte primária de leptina, é comum associar-se altos níveis deste hormônio à obesidade. Porém, indivíduos obesos não apresentam supressão do apetite, pois são, na verdade, resistentes às ações anorexígenas da leptina em nível central. Sugere-se que essa alteração seja decorrente de um comprometimento no transporte da leptina pela barreira hematoencefálica, de anormalidade nos seus receptores hipotalâmicos ou alterações na sinalização intracelular desta via, resultando em perda da sensibilidade a esse hormônio (McMILLEN, ADAM, BEVERLY, 2005; SOLIMAN, SANCTIS, ELALAILY, 2014).

Embora tenham exibido aos 21 dias uma TEGP superior a dos animais pertencentes às ninhadas normais, as fêmeas não demonstraram diferenças e os machos NR apresentaram uma TEGP 15% menor em relação ao grupo controle de jovens adultos, indicando uma maior velocidade no ganho de peso do grupo apenas durante o período de lactação. Essa evidência sugere, mais uma vez, o importante papel de uma maior disponibilidade e qualidade nutricional do leite ofertado por mães com menor número de filhotes (FIOROTTO et al, 1991).

A presença de padrões alimentares e hídricos praticamente similares entre as ninhadas normais e reduzidas durante a juventude e início da fase adulta reforça a suspeita de que a manutenção do sobrepeso nas proles menores não seja decorrente de um maior consumo alimentar após o desmame, mas sim de outros fatores envolvidos no metabolismo desses animais. Contradizendo as hipóteses hiperfágicas defendidas por alguns autores (RODRIGUES et al, 2007; RODRIGUES et al, 2009; RODRIGUES et al, 2011; GOMES et al, 2012; LUTZ, WOODS, 2012), Stefanidis e Spencer (2012) fundamentam essa tese no fato de os animais advindos de ninhadas reduzidas apresentarem uma redução no gasto energético na adolescência e na produção térmica basal do TAM na fase adulta (STEFANIDIS, SPENCER, 2012).

A redução da ninhada ocasionou também aumentos na glicemia dos animais NR em resposta ao TTOG. Com exceção das fêmeas de 21 dias, todos os animais submetidos ao protocolo de superalimentação pós-natal apresentaram aumento da área sob a curva (AUC) quando comparados aos controles, perfil análogo ao visto por You e colaboradores (1990), Gomes e colaboradores (2012) e Rinaldi e

colaboradores (2012), o qual revela um quadro sugestivo de intolerância à glicose. Tendo em mente que o AUC indica a biodisponibilidade do composto, ou seja, avalia a concentração plasmática daquela substância ao longo do tempo, o aumento nesse parâmetro visto nos grupos NR seria um indicativo de que a glicose estaria permanecendo mais tempo no sangue desses animais e revelaria assim um possível quadro de resistência às ações da insulina (RINALDI et al, 2012). Em concordância, a literatura tem relacionado a obesidade advinda da redução da ninhada com a hiperinsulinemia pós-natal, a qual perdura até a idade adulta, e a consequente predisposição para o desenvolvimento de SM e diabetes mellitus do tipo 2 (McMILLEN, ADAM, BEVERLY, 2005; PLAGEMANN, 2005; RINALDI et al, 2012).

A insulina é produzida pelas células β -pancreáticas e estimula a captação, estocagem e utilização de glicose pelos tecidos, em especial os tecidos adiposo e muscular. Isso se dá através de uma cascata de fosforilação intracelular que resulta na exteriorização do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT-4 – *glucose transporter type 4*) para a membrana plasmática, e consequente transporte da glicose para o interior da célula (CZECH, 1995; RINALDI et al, 2012). Estudos demonstraram uma menor expressão de GLUT-4 nas membranas celulares de animais NR, causando alterações na via de sinalização da insulina e resultando, assim, em menor sensibilidade a esse hormônio (RODRIGUES et al, 2007; GOMES et al, 2012). Ademais, tal hormônio relaciona-se também com a saciedade, uma vez que atua em centros neuronais relacionados à ingestão calórica e tem sua secreção regulada, ao menos parcialmente, pelos núcleos hipotalâmicos VMH e LHA, havendo relatos, inclusive, de hiperinsulinemia em animais com lesão no VMH (POWLEY, LAUGHTON, 1981; PLAGEMANN et al, 1992; McMILLEN, ADAM, BEVERLY, 2005).

Ainda sobre a participação do hipotálamo sobre o perfil glicêmico, sabe-se que a estimulação de VMH resulta em aumento da glicemia e, embora os mecanismos responsáveis ainda não estejam completamente esclarecidos, acredita-se que tal capacidade se deva à expressão do fator esteroidogênico-1 (*steroidogenic factor 1* – SF1) em determinados grupos de neurônios presentes nesse núcleo (MAJDIC et al, 2002; ZHAO et al, 2004). Sabe-se também que tal grupo de neurônios pode apresentar diferentes mecanismos de ativação, cujos efeitos podem ser opostos. Com isso, ativação de SF1 via canal de rodopsina 2 (*channelrhodopsin 2* – ChR2) levaria à hiperglicemia, enquanto a via hM3Dq (forma modificada do

receptor muscarínico M3) resultaria em aumento da sensibilidade à insulina e do consumo de glicose pelo organismo, bem como a produção hepática de glicose, promovendo assim a manutenção da glicemia a níveis basais e explicitando o importante papel do VMH sobre o metabolismo glicêmico (ALEXANDER, et al, 2009; MEEK et al, 2016; COUTINHO et al, 2017).

Ainda em relação ao SNC, sabe-se que o sistema nervoso autônomo exerce papel importante no controle do metabolismo, sendo a obesidade associada a diminuições na atividade simpática e aumentos na parassimpática, resultando, assim, em descontrole energético (RINALDI et al, 2012). Dada a relevância do nervo vago para o funcionamento de órgãos como intestino, fígado e tecido adiposo visceral, a hiperatividade parassimpática vagal encontrada em animais NR causaria alterações não apenas na secreção de insulina, como também na homeostase glicêmica como um todo (LAUSIER et al, 2010).

Periféricamente, não observamos diferenças significativas nas massas relativas da hipófise e da adrenal dos filhotes e tampouco dos adultos jovens advindos do modelo de NR quando comparados a animais NN. Estudos sobre alterações estruturais nesses órgãos derivadas apenas da superalimentação neonatal são raros, concentrando-se mais em alterações decorrentes de fatores externos. A alteração na função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal foi estudada por Hou e colaboradores (2011), os quais demonstraram que a superalimentação neonatal foi capaz de aumentar os níveis de corticosterona nos animais NR, acentuando, assim, as respostas a situações de estresse agudo. O aumento responsividade da adrenal a desafios imunes também já foi reportado em resposta à redução da ninhada, assim como a redução da expressão do receptor para leptina na adrenal de prole NR no período neonatal e vida adulta (SOMINSKY et al, 2017).

No que diz respeito ao dimorfismo sexual, vimos que fêmeas de ambos os grupos apresentaram valores de massa de adrenal e hipófise superiores aos encontrados em machos, efeito que aparenta ser advindo do efeito trófico exercido pelo estradiol sobre esses órgãos. Especulamos também que tais diferenças possam ter sofrido influência da correção por 100g de massa corporal, uma vez que machos possuem um peso total maior que as fêmeas, resultando assim em uma massa corrigida erroneamente inferior a encontrada nos indivíduos do sexo feminino.

Além dos efeitos relatados anteriormente sobre o acúmulo de gordura

visceral, que contribui para o desenvolvimento da obesidade, observamos alterações na massa do TAM, o qual se relaciona com o controle da temperatura corporal e gasto energético basal. Assim como relatado por Almeida e colaboradores (2013), a massa do TAM interescapular mostrou-se elevada nos filhotes NR em nosso estudo. Esse aumento, porém, não evitou que os animais desse grupo tivessem maior ganho de peso que os do grupo controle, possivelmente devido a presença de um menor gasto energético e produção de calor, conforme evidenciado na literatura (ALMEIDA et al, 2013).

Essa hipoatividade termogênica poderia ser advinda de uma diferenciação de TAM a TAB, favorecida neste modelo, o que promoveria um acúmulo de gotículas lipídicas mais periféricamente dentro do adipócito marrom, tornando-o funcionalmente mais parecido com o adipócito branco, ou seja, reduzindo sua participação na produção de calor (RAVUSSIN, GALGANI, 2011). Tais mudanças não estariam restritas apenas ao aspecto morfológico dos adipócitos, mas também ao funcionamento do tecido, por meio de uma expressão diminuída da UCP-1, a qual está presente na matriz mitocondrial e é capaz de desacoplar o mecanismo de fosforilação oxidativa da cadeia respiratória, fazendo com que parte da energia originada no ciclo de Krebs seja dissipada na forma de calor (BIANCO, 2000; PEIXOTO et al, 2018). A expressão de UCP-1 sofre regulação de hormônios tireoidianos, especialmente a tri-iodotironina (T3) e a conversão local do pró-hormônio tiroxina à forma ativa T3 é feita pela enzima deiodinase do tipo 2 (D2), cuja atividade é regulada por estimulação adrenérgica. Assim sendo, a termogênese sem tremor é regulada principalmente por hormônios tireoidianos e pelo sistema nervoso simpático (ENERBACK et al, 1997; JESUS et al, 2001; PEIXOTO et al, 2018).

De fato, estudos indicam que ocorra disfunção tireoidiana em animais submetidos ao protocolo de redução de ninhada, os quais apresentam aumento nos níveis de hormônio estimulante da tireoide (TSH) e hipotireoidismo na vida adulta (RODRIGUES et al, 2009), fato que pode ser responsável pela menor temperatura corporal verificada nestes animais (ALMEIDA et al, 2013). Foi observada também uma desregulação no sistema nervoso autônomo de animais obesos, gerando diminuição do tônus simpático e aumento da atividade vagal (ALMEIDA et al, 2013), fato amparado pela redução da obesidade e da massa do TAM em animais que submetidos a vagotomia (INOUE et al, 1991). Ademais, a hipercorticosteronemia, comumente detectada em animais NR, tem sido relacionada a uma diminuição da

atividade da D2 em tecidos periféricos, incluindo o TAM, fato que pode estar contribuindo ainda mais para a diminuição da atividade termogênica do tecido (HOU et al, 2011).

Finalmente, em relação a expressão hipotalâmica de CB1, nossos dados indicaram que a redução da ninhada gerou uma maior expressão no ARC de machos jovens que receberam uma sobrecarga de glicose, efeito semelhante ao visto no PVN de fêmeas adultas submetidas ao mesmo procedimento. Os receptores canabinóides estão amplamente distribuídos ao longo do SNC e apresentam papel importante na regulação da ingestão calórica realizada nos núcleos hipotalâmicos (WITTMANN et al, 2007), podendo exercer papel modulador sobre neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos que controlam o consumo alimentar.

Estudos indicam uma coexpressão de CB1 e receptor para orexina-1 no hipotálamo, a qual se revelou aumentada em animais com obesidade induzida por dieta (YANG et al, 2018). Além disso, resultados desse mesmo grupo indicam um aumento na taxa de disparos de neurônios estimulados por glicose após a administração conjunta de orexina A e antagonista para CB1, revelando uma função integrada desses dois sistemas na regulação da ingesta alimentar.

Acredita-se que o papel orexígeno do SEC possa ser exercido também através da inibição da liberação de substâncias supressoras do apetite, uma vez que a presença de receptores CB1 também já foi relatada em conjunto com neuromoduladores anorexígenos, como CRH (CARDINAL et al, 2014), MSH (VERTY et al, 2004) e CART (OSEI-HYIAMAN et al, 2005). Desta forma, animais com deficiência na FAAH – enzima responsável pela degradação de AEA – apresentam liberação reduzida de CART em regiões relacionadas ao controle do apetite (OSEI-HYIAMAN et al, 2005), enquanto o bloqueio periférico de CB1 contribui para a restauração da sensibilidade à leptina em animais obesos através da reativação da sinalização de melanocortina no hipotálamo (TAM et al, 2017).

Estudos em animais detectaram uma maior sensibilidade de fêmeas aos efeitos da administração de canabinóides sobre a locomoção, aprendizagem espacial, nocicepção e indução de vício, assim como sobre o comportamento depressivo e a ansiedade (CHA et al, 2007; FATTORE et al, 2007; CRAFT et al, 2012; CRAFT, MARUSICH, WILEY, 2013). Xing e colaboradores (2014) observaram maiores níveis basais de RNAm para CB1 e CB2 na amígdala, hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo de ratas adolescentes quando comparadas a machos com a

mesma idade, dados consistentes com outros estudos que identificaram maior expressão de CB1 também no cerebelo e no tronco encefálico de fêmeas (XING et al, 2011). Esses resultados sinalizam para um potencial papel modulatório dos esteroides sexuais sobre o SEC, o que já havia sido hipotetizado outras vezes, como na análise de Rodriguez de Fonseca e colaboradores (1994), os quais observaram redução na densidade cerebral de CB1 de ratos submetidos a ovariectomia ou castração, seguida por sua restauração após tratamento com hormônios sexuais.

Interessantemente, uma menor expressão de CB1 foi vista no ARC de fêmeas adultas que foram submetidas ao jejum, fato que sugere uma menor sensibilidade aos efeitos orexígenos do sistema endocanabinóide. Uma possível explicação para isso seria o fato de o estradiol ter papel atenuador dos mediadores orexígenos e potencializador dos anorexígenos, resultando assim em uma menor sensibilidade aos efeitos hiperfágicos em mulheres adultas quando comparadas ao sexo oposto (MELA et al, 2016). Tal resultado pode também estar relacionado ao proposto por Diaz e colaboradores (2009), os quais afirmam que machos são mais sensíveis a alterações nesse sistema, sofrendo, inclusive, maiores efeitos hipofágicos após administração de antagonistas de CB1 e indicando que, embora indivíduos do sexo feminino geralmente sejam suscetíveis aos efeitos do SEC, tal regra pode não ser aplicada na variável alimentação.

No que diz respeito ao padrão alimentar pré-teste, sendo o sistema endocanabinóide um complexo responsável por modular positivamente o apetite e induzir a procura por alimentos, era de se esperar que, em condições normais, o jejum elevasse os níveis de ECB no hipotálamo, enquanto a ingestão alimentar gerasse o efeito oposto (KIRKHAM et al, 2002; FRANCISCHETTI, ABREU, 2006). Nesse sentido, observamos uma maior expressão no receptor CB1 no ARC e PVN de todos os grupos aos 21 dias, independente do sexo ou tratamento, que foram submetidos ao jejum quando comparados aos animais que receberam sobrecarga de glicose, resposta condizente com a correta regulação do SEC.

Por outro lado, nos grupos de 60 dias foi vista uma elevação na expressão de CB1 após os animais receberem a glicose. Acreditamos que esse aparente desequilíbrio pós-prandial do SEC poderia ser consequência da obesidade, a qual resultaria em uma hiperativação do SEC mesmo após a ingestão de nutrientes, isso não justifica, porém, o aumento pós-gavagem encontrado nos animais NN. Outra possibilidade seria a de que, sendo a glicose uma substância com alta

palatabilidade, esses animais adultos poderiam ter sofrido um efeito hedônico da ingestão de alimentos, o que teria ocasionado essa maior expressão de CB1 (KIRKHAM, 2002; FRANCISCHETTI, ABREU, 2006; ENGELI et al, 2014). Essa hipótese confirmaria os aumentos de 2-AG circulante após a ingestão de alimentos saborosos, mas não após alimentos sem sabor, relatados por Monteleone e colaboradores (2012).

Sabe-se que o aumento da adiposidade abdominal e o desenvolvimento da obesidade vêm sendo relatados em conjunto com níveis elevados de ECB circulantes (DI MARZO, PETROSINO, 2007; LAHESMAA et al, 2018), em especial de AEA (ENGELI et al 2014), não apenas no SNC, mas no organismo como um todo. Antagonistas canabinóides têm sido estudados há anos e, embora tenham se mostrado efetivos no controle dos efeitos metabólicos da obesidade, os efeitos adversos de sua atuação central são preocupantes (ARGUETA et al, 2019). Diante disso, fármacos que restrinjam sua ação à periferia têm se tornado foco de estudo e, por conseguinte, relevado a importância de se conhecer melhor o papel dos demais componentes não centrais desse sistema na fisiopatologia da obesidade.

Com isso, a fim de melhor investigar os efeitos o sistema endocanabinóide periférico em animais submetidos a redução da ninhada, realizamos a determinação da expressão relativa de RNAm para CB1 no TAB de animais oriundos de NN e NRs e observamos, tanto em fêmeas quanto em machos, uma menor expressão de CB1 nos grupos de 21 dias submetidos à redução da ninhada, e uma maior expressão nas fêmeas NR de 60 dias.

Embora alguns estudos tenham descrito aumento nos níveis de CB1 (MURDOLO et al, 2007; YAN et al, 2007), a maior parte dos estudos confirma o obtido em nossos experimentos, relatando não apenas uma diminuição nos níveis proteicos ou de RNAm para CB1, como também nos níveis de FAAH no TAB de indivíduos obesos (ENGELI et al, 2005; BLUHER et al, 2006; KEMPF et al, 2007), o que nos leva a crer que o aumento nos níveis circulantes de ECBs possa ser consequência de uma diminuição da degradação enzimática dessas substâncias. A manutenção dessas altas concentrações de ECB por períodos crônicos, por sua vez, induziria uma menor expressão de CB1 tanto no SNC quanto no TAB, caracterizando assim um processo de *downregulation* do sistema endocanabinóide (LAHESMAA et al, 2018).

Ainda em relação ao SEC no tecido adiposo, diversos autores têm se dedicado ao estudo do tema e, em sua grande maioria, tem escolhido seres adultos como objeto de pesquisa. Dados recentes da OMS (2017), por outro lado, estimam que o número de crianças obesas pode chegar a 70 milhões em 2025, relevando a suma importância de se analisar o problema em fases mais precoces da vida. Nesse sentido, Karvela e colaboradores (2010), em seu estudo envolvendo jovens pré-púberes, identificou menor expressão de CB1 em crianças obesas quando comparadas a indivíduos magros com a mesma idade, resultados semelhantes aos encontrados em nossos animais de 21 dias.

Durante a puberdade as demandas metabólicas aumentam bastante, o que faz necessário um aumento nos estoques energéticos para que o crescimento ocorra de forma adequada. Por favorecer a ingestão alimentar e a lipogênese, o SEC se apresenta como um importante modulador durante essa fase do desenvolvimento e aumentos nos níveis de ECB e suas enzimas sintetizadoras são comumente vistos como parte das alterações fisiológicas típicas dessa idade (ROEMMICH, ROGOL, 1999). Em contrapartida, jovens obesos apresentam menores concentrações de CB1, possivelmente a fim de tentar inibir aumentos ainda maiores na lipogênese que já foi induzida pela presença de obesidade central (KARVELA et al, 2010). Essa diminuição na expressão de CB1 não ocorre em humanos adultos (MURDOLO et al, 2007; BORDICCHIA et al, 2010; ENGELI et al, 2014), o que nos faz enfatizar, mais uma vez, a necessidade de se incluir diferentes janelas experimentais para o estudo dos determinantes da obesidade.

8 CONCLUSÃO

No presente estudo nossos dados confirmaram que o modelo de superalimentação pós-natal originado pela manipulação do tamanho da ninhada causa alterações metabólicas em ratos Wistar jovens de ambos os sexos, resultando em modificações na massa corporal, ingestões alimentar e hídrica, massa de tecidos relacionados à função endócrina e metabólica e perfis glicêmico e lipídico, além de alterar a expressão do receptor CB1 em núcleos hipotalâmicos relacionados ao controle da ingestão calórica e a expressão de RNAm para CB1 no tecido adiposo branco em ambas as janelas experimentais estudadas.

Em conjunto, esses resultados demonstram a importância da nutrição como um fator de programação neonatal, determinando o desenvolvimento da obesidade na prole. Ademais, eles podem contribuir para uma melhor compreensão acerca das mudanças metabólicas decorrentes do sobrepeso e de suas consequências, assim como para o desenvolvimento de mecanismos de prevenção e controle dessas mudanças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, C.; CASTILLO, V.; LLANOS, M. Oral Administration of the Endocannabinoid Anandamide during Lactation: Effects on Hypothalamic Cannabinoid Type 1 Receptor and Food Intake in Adult Mice. *J Nutr Metabol*, v. 2017, p. 1-5, 2017.

ALMEIDA, D. L. et al. Early overfeed-induced obesity leads to brown adipose tissue hypoactivity in rats. *Cell Physiol Biochem*, v. 32, p. 1621-1630, 2013.

ALVES, A. O.; SPANIOL, B.; LINDEN, R. Canabinoides sintéticos: drogas de abuso emergentes. *Arc Clin Psychiatry (São Paulo)*, v. 39, n. 4, p. 142-148, 2012.

ARGUETA, D. A. et al. cannabinoid CB1 receptors inhibit gut-brain satiation signaling in diet-induced obesity. *Front Physiol*, v. 10, art. 704, 2019.

BARNES, M. J.; LAPANOWSKI, K.; CONLEY, A. et al. High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic mu opioid receptors. *Brain Res Bull*, v. 61, n. 5, p. 511-519, 2003.

BASTARD, J P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*, v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.

BIANCO, A. C. Hormônios tireóideos, UCPs e termogênese. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 44, p. 281-289, 2000.

BLUHER, M et al. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes*, v. 55, p. 3053-3060, 2006.

BORDICCHIA, M. et al. Cannabinoid CB1 receptor expression in relation to visceral adipose depots, endocannabinoid levels, microvascular damage, and the presence of the Cnr1 A3813G variant in humans. *Metabolism*, v. 59, p. 734-741, 2010.

BREIVOGEL, C. S.; SIM-SELLEY, L. J. Basic neuroanatomy and neuropharmacology of cannabinoids. *Int Rev Psychiatry*, v. 21, n. 2, p. 113-121, 2009.

BYERLY, M. S. et al. Stage-specific inhibition of TrkB activity leads to long-lasting and sexual dimorphic effects on body weight and hypothalamic gene expression. *PLOS ONE*, v. 8, e80781, 2013.

CARDINAL, P. et al. CB1 cannabinoid receptor in SF1-expressing neurons of the ventromedial hypothalamus determines metabolic responses to diet and leptin. *Mol Metab*, v. 3, n. 7, p. 705-716, 2014.

- CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JR, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: Lições aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 50, n. 2, p. 190-197, 2006.
- CHA, Y. M. et al. Sex differences in the effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on spatial learning in adolescent and adult rats. *Behav Pharmacol*, v. 18, p. 563–569, 2007.
- CHIRCHIGLIA, D.; TORRE, A. T.; CHIRCHIGLIA, P. Focus on the endogenous cannabinoid system in migraine. *Eur Med J*, v. 5, n. 1, p. 88-91, 2017.
- CONCEIÇÃO, E. P. S. et al. Higher White adipocyte area and lower leptina production in adult rats overfed during lactation. *Horm Metab Res.* v. 43, p. 513-516, 2011.
- COSTA, J. L. G. P. et al. Neurobiologia da Cannabis: do sistema endocanabinoide aos transtornos por uso de Cannabis. *J B Psiquiatr*, v. 60, n. 2, p. 111-122, 2011.
- COTA, D. et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*, v. 112, n. 3, p. 423-431, 2003.
- CRAFT, R. M. et al. Sex differences in CB1 vs. CB2 receptor-selective antagonism of antinociception produced by delta-9-THC and CP55,490 in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 340, n. 3, p. 787-800, 2012.
- CRAFT, R. M., MARUSICH, J. A.; WILEY, J. L. Sex differences in cannabinoid pharmacology: A reflection of differences in the endocannabinoid system? *Life*, v. 92, p. 476-481, 2013.
- CZECH, M. P. Molecular actions of insulin on glucose transport. *Annu Rev Nutr*, v. 15, p. 441-471, 1995.
- DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, v. 23, n. 1, p. 1-15, 2009.
- DI MARZO, V.; PETROSINO, S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol*, v. 18, p. 129-140, 2007.
- DIAZ, S. et al. Sex Differences in the Cannabinoid Modulation of Appetite, Body Temperature and Neurotransmission at POMC Synapses. *Neuroendocrinology*, v. 89, p. 424-440, 2009.
- DYALL, S. C. Interplay Between n-3 and n-6 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and the Endocannabinoid System in Brain Protection and Repair. *Lipids*, v. 52, n. 11, p. 885-900, 2017.

ELPHICK, M. R.; EGERTOVA, M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 356, n. 1407, p. 381-408, 2001.

ENERBACK, S. et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, v. 387, p. 90-94, 1997.

ENES-MARQUES, S. Influência da redução de ninhada sobre o comportamento materno e respostas comportamentais e endócrinas da prole na fase adulta. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas – MG, 2014.

ENES-MARQUES, S. E.; GIUSTI-PAIVA, A. Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. *J Physiol Sci* (2018). DOI 10.1007/s12576-018-0594-8.

ENGELI, S. Dysregulation of the Endocannabinoid System in Obesity. *J Neuroendocrinol*, v. 20, n. s1, p. 110-115, 2008.

ENGELI, S. et al. Activation of the Peripheral Endocannabinoid System in Human Obesity. *Diabetes*, v. 54, n. 10, p. 2838-2843, 2005.

ENGELI, S. et al. Influence of Dietary Fat Intake on the Endocannabinoid System in Lean and Obese Subjects. *Obesity*, v. 22, n. 5, p. 70-76, 2014.

ESTRELA, D. C. Obesidade e estresse crônico em fêmeas de ratos Wistar: avaliação comportamental, bioquímica e hematológica. 89f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

FALUDI, A. A. et al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*, v. 209, n. 1. 2017.

FATTORE, L et al. Drug- and cue-induced reinstatement of cannabinoid-seeking behaviour of male and female rats: influence of ovarian hormones. *Br J Pharmacol*. 2010; 160:724–735, 2010.

FIOROTTO, M. L. et al. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium or large litters. *Am J Physiol*. v. 260, n. 6 Pt2, p. R1104-R1113, 1991.

FRANCISCHETTI, E. A.; ABREU, V. G. O sistema endocanabinóide: nova perspectiva no controle de fatores de risco cardiometabólico. *Arq Bras Cardiol*, v. 87, n. 4, p. 548-558, 2006.

GALLETTI, J. et al. Avaliação dos parâmetros biométricos de obesidade e níveis séricos de PCR-AS em ratos obesos jovens. VI Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica - CESUMAR. 2012.

GODOY-MATOS, A. F. et al. O Sistema Endocanabinóide: Novo Paradigma no Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 50, n. 2, p. 390-399, 2006.

GOMES, R. M et al. Efeito de um programa de exercício físico moderado em ratos de diferentes modelos de obesidade. *Rev Educ Fis/UEM*, v. 23, p. 285-294, 2012.

GROVE, K. L.; SMITH, M. S. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav*, v. 79, p. 47-63, 2003.

HABBOU, A. et al. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short and long-term pathophysiological consequences. *ASN*, p. 553-562, 2013.

HERMANUSSEN, M. et al. Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. *Eur J Clin Nutr*, v. 60, p. 25 – 31, 2006.

HOU, M. et al. Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. *PLOS ONE*, v. 6, e25726, 2011.

INOUE, S. et al. Role of the efferent and afferent vagus nerve in the development of ventromedial hypothalamic obesity. *Brain Research Bulletin*, v. 27, p. 511-515, 1991.

JESUS, L. A., et al. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptative thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest*, v. 108, p. 1379-1385, 2001.

JORDAN, S. D.; KONNER, A. C.; BRUNING, J. C. Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci*, v.67, p. 3255-3273, 2010.

KANASAKI, K.; KOYA, D. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol*, v. 2011, p. 1-11, 2011.

KAGOTANI, Y. et al. Development of the neuronal system containing neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Int J Dev Neurosci*, v. 7, p. 359-374, 1989.

KARVELA, A. et al. Endocannabinoid (EC) Receptor, CB1, and EC Enzymes' Expression in Primary Adipocyte Cultures of Lean and Obese Pre-pubertal Children in Relation to Adiponectin and Insulin. *JPEM*, v. 23, p. 1011-1024, 2010.

KEMPF, K. et al Immune-mediated activation of the endocannabinoid system in visceral adipose tissue in obesity. *Horm Metab Res*, v. 39, p. 596-600, 2007.

Kirkham, T. C. et al. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol*, v. 136, p. 550-557. 2002.

KRUK-SLOMKA, M. et al. Endocannabinoid System: the Direct and Indirect Involvement in the Memory and Learning Processes—a Short Review. *Mol Neurobiol*, v. 54, n. 10, p. 8332-8347, 2016.

KUMARESAN, P.; ANDERSON, R. R.; TURNER, C. W. Effect of litter size upon milk yield and litter weight gains in rats. *Revue de tuberculose et de pneumologie*, v. 30, p. 41-45, 1967.

LACERDA, R. N. et al. O efeito da redução da ninhada na instalação da obesidade MSG. In: *Anais da 58a Reunião Anual da SBPC*. [s.l.: s.n.], 2006.

LAHESMAA, M. et al. Cannabinoid Type 1 Receptors Are Upregulated During Acute Activation of Brown Adipose Tissue. *Diabetes*, v. 67, p. 1226-1235, 2018.

LAUSIER, J. et al. Vagal control of pancreatic δ -cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 299, n. 5, p. 786-793, 2010.

LEE, M. O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. *American Physiological Society*, p. 24-33, 1929.

LEVIN, B. E. Developmental gene x environment interactions affecting systems regulating energy homeostasis and obesity. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 31, p. 270-283, 2010.

LIPINA, C. et al. Endocannabinoids in obesity: brewing up the perfect metabolic storm? *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, v. 2, n. 2, p. 49-63, 2013.

LÓPEZ, I. P. et al. DNA Microarray Analysis of Genes Differentially Expressed in Diet-Induced (Cafeteria) Obese Rats. *Obesity Research*, v. 11, n. 2, p. 188-194, 2003.

LUTZ, T. A.; WOODS, S. C. Overview of animal models of obesity. *NIH: Curr Protoc Pharmacol*, c. 5, p. 1-22, 2012.

MALAFAIA, A. B. et al. Obesity induction with high fat sucrose in rats. *Arq Bras Cir Dig*, v. 26, p. 17-21, 2013.

MARANGON, P. B. Participação do fator liberador de corticotrofina nos efeitos do estradiol no controle da homeostase energética. *Mestre em Ciências*, Universidade de São Paulo, 2011.

McMILLEN, I. C.; ADAM, C. L.; BEVERLY, S. M. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *J Physiol*, v. 565, p. 9-17, 2005.

MELA, V. et al. Modulatory influences of estradiol and other anorexigenic hormones on metabotropic, Gi/o-coupled receptor function in the hypothalamic

control of energy homeostasis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 160, p. 15-26, 2016.

MILANSKI, M. et al. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. *J Neurosci*, v. 29, n. 2, p. 359-370, 2009.

MITTENDORFER, B. Sexual dimorphism in human lipid metabolism. *J Nutr*, v. 135, p. 681- 686, 2005.

MONTELEONE, P. et al. Hedonic eating is associated with increased peripheral levels of ghrelin and the endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol in healthy humans: a pilot study. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 97, p. 917-924, 2012.

MOROZOV, Y. M. et al. Cannabinoid type 1 receptor-containing axons innervate NPY/AgRP neurons in the mouse arcuate nucleus. *Molecular Metabolism*, v. 6, n. 4, p. 374-381, 2017.

MOCARZEL, C. C. Epidemia da obesidade e o papel do obstetra. *FEMINA*, v. 42, n. 1, 2014.

MOZES, S.; SEFCÓKOVÁ, Z.; RACEK, L. Long-term effect of altered nutrition induced by litter size manipulation and cross-fostering in suckling male rats on development of obesity risk and health complications. *Eur J Nutr* (2013). DOI 10.1007/s00394-013-0630-7.

MURDOLO, G. et al. Insulin differentially modulates the peripheral endocannabinoid system in human subcutaneous abdominal adipose tissue from lean and obese individuals. *J Endocrinol Invest*, v. 30, p. 17-21, 2007.

NEMEROFF, C. B. et al. Growth, endocrinological and behavioral deficits after monosodium l-glutamate in the neonatal rat: possible involvement of arcuate dopamine neuron damage. *Psychoneuroendocrinology*, v. 2, n. 2, p. 179-196, 1977.

NERY, C. S. et al. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. *Rev Bras Med Esporte*, v. 17, p. 49-55, 2011.

OSEI-HYIAMAN, D. et al. Cocaine and amphetamine-related transcript is involved in the orexigenic effect of endogenous anandamide. *Neuroendocrinology*, v. 81, p. 273-282, 2005.

PAGOTTO, U et al. How many sites of action for endocannabinoids to control energy metabolism? *Int J Obes*, v. 30, p. S39-S43, 2006.

PEIXOTO, T. C. et al. Neonatal tobacco smoke reduces thermogenesis capacity in brown adipose tissue in adult rats. *Bras J Med Biol Res*, v.51, e6982, 2018.

PLAGEMANN, A et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol*, v. 99, p. 154-158, 1992.

PLAGEMANN, A. et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Research*. v. .836, n. 1-2, p. 146-155, 1999.

PLAGEMANN, A. Perinatal programming and functional teratogenesis: Impact on body weight regulation and obesity. *Physiol Behav*, v. 86, p. 661-668, 2005.

POWER, M. L.; SCHULKIN, J. Sex differences in fat storage, fat metabolism and health risks from obesity: possible evolutionary origins. *Br J Nutr*, v. 99, p. 931-940, 2007.

POWLEY, T. L., LAUGHTON, W. Neural pathways involved in the hypothalamic integration of autonomic responses. *Diabetologia*, v. 20, p. 378-387, 1981.

RAVUSSIN, E.; GALGANI, J. E. The implication of brown adipose tissue for humans. *Annu Rev Nutr*, v. 31, p.33-47, 2011.

RIBEIRO, A. C. A. F. Efeitos da dieta de cafeteria na gestação sobre o desenvolvimento e comportamento da prole. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas – MG. 2016.

RINALDI, W. et al. Efeito da redução de ninhada sobre as respostas autonômicas e metabólicas de ratos Wistar. *Rev. Nutr.*, v. 25, p. 321-330, 2012.

ROCHA, A. L. S. Estudo da permeabilidade intestinal em pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico da obesidade pela técnica de bypass gástrico em Y de Roux. Doutor em Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

RODRIGUES, A. L. et al. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol*, v. 195, p. 485-494, 2007.

RODRIGUES, A. L. et al. Postnatal early overnutrition changes the leptin signaling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *J Physiol*, v. 587, p. 2647-2661, 2009.

RODRIGUES, A. L. et al. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem*, v. 22, p. 109-117, 2011.

RODRIGUES, A. M.; SUPPLY, H. L; RADOMINSKI, R. B. Controle neuroendócrino do peso corporal: Implicações na gênese da obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab*. v. 47, n. 4, p. 398-409, 2003.

RODRIGUEZ DE FONSECA, F. et al. Cannabinoid receptors in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. *Life Sci*, v. 54, p. 159-170, 1994.

ROEMMICH, J. N.; ROGOL, A. D. Hormonal changes during puberty and their relationship to fat distribution. *Am J Hum Biol*, v. 11, p. 209-224, 1999.

ROSINI, T. C.; DA SILVA, A. S. R.; MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

SANTOS, A. F. S et al. Influência da dopamina e seus receptores na gênese da obesidade: revisão sistemática. *Rev Neurociência*. v. 22, n. 3, p. 373-380, 2014.

SANTOS, R. D. et al. I diretriz sobre o consume de gorduras e saúde cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*, v. 100, n. 1, 2013.

SCHEPPER, J. A. et al. Cafeteria diet-induced obesity is associated with a low spontaneous growth hormone secretion and normal plasma insulin-like growth factor-I concentrations. *Growth Hormone & IGF Research*, v. 8, n. 5, p. 397-401, 1998.

SCHWARTZ, M. W. Brain pathways controlling food intake and body weight. *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 226, p. 978-981, 2001.

SCHWARTZ, M. W. et al. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. v. 98, p. 1101-1106, 1996.

SHANKAR, K. et al. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. v. 294, n. 2, p. 28-38, 2008.

SHASHIKIRAN, U.; SUDHA, V.; JAYAPRAKASH, B. What is Obesity? *Med J Malaysia*, v. 59, n. 1, p. 130-134, 2004.

SILVA, J. E. Repercussões de uma dieta hiperlipídica no período perinatal sobre a ontogênese dos reflexos e a morfometria intestinal de ratos. 70f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2014.

SILVA, J. P. et al. Interferências da programação metabólica no desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades. *Revista Salus - Journal of Health Sciences*, v. 1, n. 1, p. 91-99, 2015.

SMITH, J. T.; SPENCER, S. J. Prewaning over and underfeeding alters onset of puberty in the rat without affecting kisspeptin. *Biol Reprod*, v. 86, p. 1-8, 2012.

SOLIMAN, A.; SANCTIS, V.; ELALAILY, R. Nutrition and pubertal development. *Indian J Endocrinol Metab*, v. 18, p. 39-47, 2014.

SOMINSKY, L. et al. Early life disruption to the ghrelin system with over-eating is resolved in adulthood in male rats. *Neuropharmacology*, v. 113, p. 21-30, 2017.

SOUZA, F. Indução de obesidade em ratos através do glutamato monossódico. Avaliação biométrica. Mestre em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, 1999.

SOUZA, F. S.; TARALLI, G. Programação metabólica e prevenção da obesidade. *Pediatria moderna*. v. 48, n. 6, p. 211-213, 2012.

SOUZA, T. M. Vias metabólicas, potencial prático e antagonismo do sistema canabinóide: uma revisão bibliográfica. Graduado em Medicina, Universidade Federal da Bahia, 2012.

SPENCER, S. J.; TILBROOK, A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology*. v. 34, p. 1133-1143, 2009.
STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON M. J.; REECE, W. O. *Dukes – Fisiologia dos animais domésticos*. Cap. 35, p. 603-614, 1996.

STEFANIDIS, A.; SPENCER, S. J. Effects of Neonatal Overfeeding on Juvenile and Adult Feeding and Energy Expenditure in the Rat. *PLOS ONE*, v. 7, n. 12, e52130. 2012.

STEPHENS, D. N. Does the Lee obesity index measure general obesity? *Physiology & Behavior*, v. 25, p. 313-315, 1980.

VERTY, A. N. A, et al. Food-anticipatory activity in activity-based anorexia: The involvement of dopamine. *Appetite*, v. 49, p. 272-341, 2007.

VOLTERA, A. F. et al. Efeito da Indução de Obesidade Neuroendócrina sobre a Hemodinâmica Sistêmica e a Função Ventricular Esquerda de Ratos Normotensos. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 52, n. 1, p. 47-54, 2008.

TAM, J. et al. Peripheral cannabinoid-1 receptor blockade restores hypothalamic leptin signaling. *Mol Met*, p. 1113-1125, 2017.

TEIXEIRA, V. P. Estudo da resistividade das vias aéreas em camundongos obesos. Mestre em Ciências, Universidade Federal de Alfenas, 2014.

TRIGO, A L. O. C. Respostas comportamentais e inflamatórias em ratos com sobrealimentação neonatal. 131f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas - MG. 2016.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health topics: Obesity. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em: 28 out. 2017.

WILLIAMS, G.; HARROLD, J. A.; CUTLER, D. J. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc*, v. 59, p. 389-396, 2000.

WITTMANN, G. et al. Distribution of Type 1 Cannabinoid Receptor (CB1)-Immunoreactive Axons in the Mouse Hypothalamus. *J Comp Neurol*, v. 503, p. 270-279, 2007.

XING, G. et al. Cannabinoid receptor expression and phosphorylation are differentially regulated between male and female cerebellum and brain stem after repeated stress: implication for PTSD and drug abuse. *Neurosci Lett*, v. 502, p. 5-9, 2011.

XING, G et al. Differential Expression of Brain Cannabinoid Receptors between Repeatedly Stressed Males and Females may Play a Role in Age and Gender-Related Difference in Traumatic Brain Injury: Implications from Animal Studies. *Front Neurol*, v. 5, art. 161, 2014.

YANG, D. et al. Orexin-A and endocannabinoid signaling regulate glucose-responsive arcuate nucleus neurons and feeding behavior in obese rats. *Neuropeptides*, v. 69, p. 26-38, 2018.

YAN, Z. C. et al. Exercise reduces adipose tissue via cannabinoid receptor type 1 which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- δ . *Biochem Biophys Res Commun*, v. 354, p. 427-433, 2007.

YOU, S. et al. Early postnatal overfeeding and diabetes susceptibility. *Exp Clin Endocrinol*, v. 96, n. 3, p. 301-306, 1990.

ZAMBERLETTI, E.; GABAGLIO, M.; PAROLARO, D. The Endocannabinoid System and Autism Spectrum Disorders: Insights from Animal Models. *Int J Mol Sci*, v. 18, n. 9, p. 1916, 2017.

ZIKO, I. et al. Neonatal overfeeding alters hypothalamic microglial profiles and central responses to immune challenge long-term. *Brain, Behav Immun*, v. 41, p. 32-43. 2014.

APROVAÇÃO DO CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da redução da ninhada e do dimorfismo sexual sobre parâmetros comportamentais e endócrinos e expressão do receptor CB1 no sistema nervoso central de ratos Wistar jovens", registrada com o nº 11/2018, sob a responsabilidade de Sílvia Graciela Ruginsk Leitão, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 02/05/2018 a 31/03/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	11 – Fêmeas 4 – Machos 108 – Filhotes
Sexo	Fêmeas/Machos
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 02 de Maio de 2018.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG