

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

SÍLVIA ENES MARQUES

RESISTÊNCIA AO *GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1* E À COLECISTOCININA-8 EM ANIMAIS MACHOS ADULTOS SUPERALIMENTADOS NA FASE NEONATAL

Alfenas / MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

SÍLVIA ENES MARQUES

RESISTÊNCIA AO *GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1* E À *COLECISTOCININA-8* EM ANIMAIS MACHOS ADULTOS SUPERALIMENTADOS NA FASE NEONATAL

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG.
Área de concentração: Neuroendocrinologia
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva
Co-Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho

Alfenas / MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Marques, Sílvia Enes.

Resistência ao glucagon-like peptide-1 e à colecistocinina-8 em animais machos adultos superalimentados na fase neonatal / Sílvia Enes Marques. -- Alfenas/MG, 2018.

116 f.: il.--

Orientador: Alexandre Giusti Paiva.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2018.

Bibliografia.

1. Hiperfagia. 2. Colecistocinina. 3. Peptídeo 1 Semelhante ao Glucagon. 4. Ganho de Peso. 5. Resistência a Medicamentos. I. Paiva, Alexandre Giusti. II. Título.

CDD-612

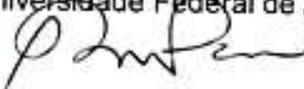
SÍLVIA ENES MARQUES

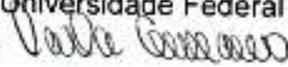
RESISTÊNCIA AO GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 E À COLECISTOCININA-8 EM ANIMAIS MACHOS ADULTOS SUPERALIMENTADOS NA FASE NEONATAL

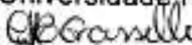
Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG.

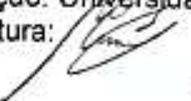
Área de concentração: Neuroendocrinologia
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva
Co-Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho

Aprovada em: 6/12/2018

Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
Assinatura: 

Profa. Dra. Carla Maria Ramos Germano
Instituição: Universidade Federal de São Carlos
Assinatura: 

Profa. Dra. Cristiane da Silva Marciano Grasselli
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
Assinatura: 

Profa. Dra. Maisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
Assinatura: 

Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Junior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
Assinatura: 

***“Tudo foi feito por meio Dele
e sem Ele nada foi feito.” Jo 1,3***

*Dedico este trabalho à Deus que por amor a nós
tudo criou e à Virgem Maria que amorosamente me
conduziu nesse caminho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua fiel companhia na água e no fogo, por me devolver a dignidade de filha e por me fazer sonhar com o céu. **À Virgem Maria**, meu exemplo maior, que com sua vida me encorajou e me ensinou a construir esse caminho de formação dando ao Senhor meu 'faça-se'. Gratidão por fazerem de mim mais do que sonhei ser!

À meu pais, Ozório e Izabel, **meus irmãos** Humberto e Lívia, **minha avó** Luzia; à minha sogra e cunhados (as): regaço acolhedor onde sempre encontrei apoio, força e exemplo. Gratidão por serem minha 'Betânia' e por não me deixarem esquecer que na vida simples de um sítio e na força de uma família unida encontramos o que nos sustenta.

Ao meu esposo Breno por ser, muitas vezes, a luz em meio as minhas trevas, pelo apoio incondicional, pela companhia nas noites de laboratório e por fazer do nosso cotidiano meu descanso. Você me motiva a ser melhor todo dia! **Ao nosso filho** Davi, que mesmo em tão pouco tempo, fez nossa vida mais completa.

À Comunidade Mariana Resgate fonte do resgate diário na minha vida, onde muitas vezes reencontrei o equilíbrio, o norte, a alegria. Gratidão pelas orações, pelas partilhas, pela vida de cada irmão que constrói a minha, por me fazerem enxergar tantas vezes que nasci pra ir além da pesquisa, por fazerem o céu na terra. Os laços que nos unem são maiores que os de sangue. Encontrei na amizade de vocês um grande tesouro!

Ao meu orientador Prof. Alexandre, que ao longo desses quase 6 anos, me ensinou o amor à pesquisa que me motivou muitas vezes a sonhar como esse trabalho. Gratidão pela apoio profissional, pela disponibilidade, pelo ensinamentos e por mostrar a seriedade desse caminho.

Ao Prof. Dr. Alex Rafacho pelas considerações e disponibilidade em contribuir com esse trabalho.

Aos amigos de laboratório e de vida que fiz durante toda essa trajetória, vocês me mostraram que a ajuda mútua e desinteressada nos fazem ir mais longe. Gratidão por fazerem a diferença e me ensinar a conviver com as diferenças. Pelos cafés, almoços, risadas, contribuições científicas e não científicas, pela ajuda nos experimentos e na vida. Vocês também são responsáveis pela realização desse trabalho!

À Profa. Dra. Cristiane Grasselli, pela orientação no estágio docente, por ser inspiração e exemplo pessoal e profissional desde os tempos da graduação. Sua humanidade e amizade são admiráveis!

Aos técnicos José Reis, Luis Felipe e Marina, pela disponibilidade e prontidão que tornaram os experimentos possíveis. À Marília, Helena, Martha, Zélia e Giselda gratidão pelo zelo com que cuidaram do laboratório e fizeram nossos dias melhores.

Aos membros da banca de qualificação Profas. Cristiane Grasselli, Fabiana Lúcio e Maísa Brigagão pelas considerações e contribuições.

Aos funcionários do Biotério Central da UNIFAL-MG.

À UNIFAL-MG e ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas por fornecer condições para a realização desse trabalho.

À CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Aos ratos sem os quais esse trabalho e a pesquisa não seriam possíveis.

À todos minha gratidão eterna!

"E agora, eis o que diz o Senhor, aquele que te criou, Jacó, e te formou, Israel: Nada temas, pois eu te resgatei, eu te chamo pelo nome, tu és meu. Se tiveres de atravessar a água, estarei contigo e os rios não te submergirão. Se caminhares pelo fogo, não te queimarás e a chama não te consumirá. Pois eu sou o Senhor, teu Deus, o Santo de Israel, teu salvador. Dou o Egito por teu resgate, a Etiópia e Sabá em compensação. Porque és precioso a meus olhos, porque eu te aprecio e te amo." (Is 43, 1-4)

RESUMO

A ingestão calórica excessiva e o rápido ganho de peso durante o período pós-natal são fatores de risco para o desenvolvimento da obesidade durante a idade adulta. Esse desfecho metabólico que resulta em ganho de peso corpóreo pode ser mediado por distúrbios endócrinos durante períodos críticos de desenvolvimento. Assim, esse trabalho propôs-se a avaliar a influência do *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) e da colecistocinina-8 (CCK-8) na homeostase energética em ratos machos adultos jovens (60 dias) superalimentados na fase neonatal, por redução no número de filhotes por ninhada (3 filhotes na ninhada reduzida (NR) vs 12 filhotes na ninhada normal(NN)). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a superalimentação na fase neonatal promoveu aumento de peso que perdurou até a fase adulta, aumento na deposição de gordura visceral (aumento de adipócitos em número e tamanho), dislipidemia, hiperleptinemia e alteração da homeostase glicêmica, incluindo o desenvolvimento de resistência à insulina. Além disso, os animais de ninhada reduzida (NR) apresentaram uma sensibilidade diminuída à noradrenalina, com menor elevação na temperatura corporal após a estimulação do tecido adiposo marrom (BAT) pelo agonista de receptor adrenérgico arterenol. Os animais NR foram resistentes à ação anorexigênica, hipoglicemiante, hiperinsulinêmica e termogênica do GLP-1. Para identificar os substratos neurais que poderiam estar envolvidos na mediação do efeito anorexígeno do GLP-1 periférico, foi avaliada a expressão de c-Fos em algumas estruturas de tronco cerebral (AP e NTS) e do encéfalo (CeA, PVN, ARC, DMH e VMH). A análise imuno-histoquímica de áreas cerebrais revelou um aumento no número de neurônios que expressam proteína c-Fos (indicador de ativação neuronal) em animais NN após a administração i.p de GLP-1. Não houve aumento na expressão de c-fos nos animais NR, indicando atenuação da sinalização central ao GLP-1. Resultados semelhantes foram encontrados para a CCK-8, i.e., animais NR apresentaram atenuação da resposta anorexigênica, termogênica, de atraso do esvaziamento gástrico e de ativação neuronal estimulada por esse hormônio. Este estudo fornece novas evidências que relacionam o sobrepeso apresentado pelos animais NR a menor responsividade ao GLP-1 e CCK-8, tanto na

supressão do apetite, quanto na elevação do gasto energético via termogênese adaptativa promovida pelo tecido adiposo marrom, que se estabelecem em decorrência de um rearranjo morfofuncional de neurônios responsáveis pela homeostase energética. Estes dados apontam que o período pós-natal é crucial no estabelecimento do controle metabólico e neural da ingestão e do crescimento corpóreo. Considerando que a superalimentação precoce exerce efeitos duradouros capazes de reprogramar esses mecanismos reguladores é importante evitar o consumo de energia excessivo nesse período de desenvolvimento.

Palavras-chave: Superalimentação. Colecistocinina. *Glucagon-like peptide-1*. Excesso de peso. Resistência.

ABSTRACT

Excessive caloric intake and rapid weight gain during the postnatal period are risk factors for the development of obesity during adulthood. This metabolic outcome that results in body weight gain may be mediated by endocrine disturbances during critical periods of development. Thus, this paper proposed to evaluate the influence of the *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) and of cholecystinin-8 (CCK-8) on energetic homeostasis in adult young male animals (60 days) overfed on neonatal phase by reduction in the number of pups by litter (3 pups in the small litter (SL) vs 12 pups in the normal litter (NL)). The results obtained in this study demonstrated that neonatal overfeeding promoted weight gain that remained until adult phase, increase in visceral fat deposition (increase in adipocytes in number and size), dyslipidemia, hyperleptinemia and altered glyceimic homeostasis, including the development of insulin resistance. Besides, small litter animals (SL) had a decreased sensitivity to noradrenalin, with lower elevation in body temperature after stimulation of brown adipose tissue (BAT) by the agonist adrenergic receptor arterenol. The SL animals were resistant to the anorexigenic, hypoglycemic, hyperinsulinemic and thermogenic action of GLP-1. To identify neural substrates that could be involved in the mediation of peripheral GLP-1, c-Fos expression was evaluated in some structures of brainstem (AP and NTS) and encephalic structures (CeA, PVN, ARC, DMH and VMH). Immunohistochemical analysis of brain areas revealed an increase in the number of neurons that express c-Fos protein (neuronal activation indicator) in NL animals after GLP-1 i.p. administration. There was no increase in c-fos expression in SL animals, indicating attenuation of central signaling to GLP-1. Similar results were found for CCK-8, i.e., SL animals showed attenuation of the anorexigenic action, thermogenic action, delayed gastric emptying and neuronal activation stimulated by this hormone. This study provides new evidence linking the overweight presented by SL animals to less responsiveness to GLP-1 and CCK-8, both in appetite suppression as energy expenditure via adaptive thermogenesis promoted by brown fat tissue, which establishes due to neurons morphofunctional rearrangement responsible for energetic homeostasis. These data reinforce that immediate post-natal period is crucial in

establishment metabolic and neural control of body ingrowth and growth. Considering that overfeeding has everlasting effects, which are capable of reprogramming these regulating mechanisms, it is important to avoid excessive energy consumption during this development period.

Key words: Overfeeding. Cholecystokinin. Glucagon-like peptide-1. Overweight. Resistance.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Representação simplificada da ação de peptídeos intestinais no hipotálamo.....	28
FIGURA 2	- Formas bioativas da Colecisticinina (CCK) e sua relação com receptor do tipo 1 (CCK1R) e (CCK2R).....	33
FIGURA 3	- Processamento pós-translacional do preproglucagon.....	36
FIGURA 4	- <i>Design</i> experimental dos experimentos realizados com <i>glucagon-like peptide-1</i> (GLP-1).....	56
FIGURA 5	- <i>Design</i> experimental dos experimentos realizados com colecistocinina-8 (CCK-8).....	57
FIGURA 6	- Efeito da superalimentação neonatal sobre a histologia dos tecidos adiposos branco epididimal (WAT) e marrom (BAT) de ratos adultos.....	63
FIGURA 7	- Efeito da superalimentação neonatal sobre o perfil glicêmico de animais machos frente o teste de tolerância oral à glicose.....	65
FIGURA 8	- Efeito da superalimentação neonatal sobre o perfil glicêmico de animais machos adultos frente o teste de tolerância intraperitoneal à insulina.....	66
FIGURA 9	- Efeito da superalimentação neonatal sobre a ingestão alimentar em filhotes machos adultos.....	67
FIGURA 10	- Efeitos da superalimentação neonatal sobre a variação da temperatura corporal em animais adultos machos frente a administração noradrenalina.....	68
FIGURA 11	- Efeito da superalimentação neonatal sobre o consumo de ração em ratos adultos frente ao desafio com <i>glucagon-like peptide-1</i>	69
FIGURA 12	- Fotomicrografias representativas do efeito da <i>Glucagon-like peptide-1</i> (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos na área postrema (AP) de ratos.....	72

FIGURA 13 - Fotomicrografias representativas do efeito do <i>Glucagon-like peptide-1</i> (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos no núcleo do trato solitário (NTS) de ratos.....	72
FIGURA 14 - Fotomicrografias representativas do efeito do <i>Glucagon-like peptide-1</i> (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos no núcleo paraventricular (PVN) de ratos.....	73
FIGURA 15 - Fotomicrografias representativas do efeito do <i>Glucagon-like peptide-1</i> (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos no hipotálamo dorsomedial (DMH) de ratos.....	73
FIGURA 16 - Fotomicrografias representativas do efeito do <i>Glucagon-like peptide-1</i> (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos no hipotálamo ventromedial (VMH) de ratos.....	74
FIGURA 17 - Fotomicrografias representativas do efeito do <i>Glucagon-like peptide-1</i> (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos no núcleo arqueado (ARC) de ratos.....	74
FIGURA 18 - Fotomicrografias representativas do efeito do <i>Glucagon-like peptide-1</i> (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos na amígdala central (CeA) de ratos.....	74
FIGURA 19 - Efeito da superalimentação neonatal sobre a variação da temperatura corporal frente da administração intracerebroventricular de salina ou <i>Glucagon-like peptide-1</i>	76
FIGURA 20 - Efeito da superalimentação neonatal sobre o consumo de ração em ratos adultos frente ao desafio com colecistocinina-8.....	77
FIGURA 21 - Efeito da superalimentação neonatal no esvaziamento gástrico em ratos machos adultos após 20 minutos da administração de CCK-8.....	79

FIGURA 22 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CKK-8) na expressão de células positivas para c-fos na área postrema (AP) de ratos.....	81
FIGURA 23 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CKK-8) na expressão de células positivas para c-fos no núcleo do trato solitário (NTS) de ratos.....	81
FIGURA 24 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CKK-8) na expressão de células positivas para c-fos no núcleo paraventricular (PVN) de ratos	82
FIGURA 25 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CKK-8) na expressão de células positivas para c-fos no hipotálamo dorsomedial (DMH) de ratos	82
FIGURA 26 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CKK-8) na expressão de células positivas para c-fos no hipotálamo ventromedial (VMH) de ratos	83
FIGURA 27 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CKK-8) na expressão de células positivas para c-fos no núcleo arqueado (ARC) de ratos	83
FIGURA 28 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CKK-8) na expressão de células positivas para c-fos na amígdala central (CeA) de ratos	84
FIGURA 29 - Efeito da superalimentação neonatal sobre a variação da temperatura corporal frente a administração intracerebroventricular de salina ou Colecistocinina-8.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito da superalimentação neonatal sobre o peso da ninhada durante o período lactacional	61
Tabela 2 -	Efeito da superalimentação neonatal sobre o peso dos animais pós-desmame	62
Tabela 3 -	Efeito da superalimentação neonatal sobre o Índice de Lee e adiposidade das proles	62
Tabela 4 -	Efeito as superalimentação neonatal sobre o perfil bioquímico e hormonal de ratos adultos	64
Tabela 5 -	Análise de variância de duas vias da glicemia plasmática de ratos submetidos ao teste de tolerância oral à glicose	65
Tabela 6 -	Análise de variância de duas vias da glicemia plasmática de ratos submetidos ao teste de tolerância intraperitoneal à insulina	66
Tabela 7 -	Análise de variância de duas vias da ingestão de ração por ratos adultos pós-desmame.....	67
Tabela 8 -	Análise de variância de duas vias da ingestão alimentar por ratos adultos frente aos desafio com <i>glucagon-like peptide-1</i>	69
Tabela 9 -	Efeito da superalimentação neonatal sobre as respostas glicêmica e insulinêmica ratos machos adultos frente ao <i>glucagon-like peptide-1</i>	70
Tabela 10 -	Efeitos da superalimentação neonatal e do <i>glucagon-like peptide-1</i> (GLP-1, 10µg/Kg) na expressão de células positivas para c-fos no encéfalo de ratos adultos.....	71
Tabela 11 -	Análise de variância de duas vias do número de células positivas para c-FOS no encéfalo de ratos adultos frente ao <i>glucagon-like peptide-1</i>	71

Tabela 12 -	Análise de variância de duas vias do índice térmico do intervalo de 10 a 75 minutos após a em ratos adultos frente ao desafio com <i>glucagon-like peptide-1</i>	76
Tabela 13 -	Análise de variância de duas vias da ingestão alimentar por ratos adultos frente ao desafio com colecistocinina-8	78
Tabela 14 -	Efeitos da superalimentação neonatal e da colecistocinina-8 (CCK-8, 0.5µg/Kg) na expressão de células positivas para c-fos no encéfalo de ratos adultos	80
Tabela 15 -	Análise de variância de duas vias do número de células positivas para c-FOS no encéfalo de ratos adultos frente ao desafio com colecistocinina-8.....	80
Tabela 15 -	Análise de variância de duas vias do índice térmico do intervalo de 10 a 180 minutos após a administração de CCK-8.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADRBβ	– Receptor β adrenérgico
AGRP	– <i>Agouti related neuropeptide</i>
AP	– Área postrema
ARC	– Núcleo arqueado
AUC	– Área sob a curva
BAT	– Tecido adiposo marrom
CART	– Transcritos relacionados à cocaína e anfetamina
CNA	– Comprimento nasoanal
CCK	– Colecistocinina
CCK1R	– Receptor de colecistocinina 1
CCK2R	– Receptor de colecistocinina 2
CeA	– Amígdala central
Cm	– Centrímetro
DL	– Dia de lactação
dL	– Decilitro
DMH	– Hipotálamo dorsomedial
DPP-IV	– Dipeptidil peptidase IV
EPM	– Erro padrão da média
FIG	– Figura
G	– grama
GLP-1	– <i>Glucagon-like peptide 1</i>
GLP-1R	– Receptor de GLP-1
GLP-2	– <i>Glucagon-like peptide 2</i>
GRPP	– Polipeptídio pancreático relacionado com glicentina
GTT_o	– Teste de tolerância oral à glicose
H	– Hora
H/E	– Hematoxilina e eosina
HDL-c	– Proteína de alta densidade
HF	– <i>High fat</i>

HOMA-IR	– Modelo homeostático de avaliação
HSL	– Lipase hormônio sensível
i.c.v	– Intracerebroventricular
i.p	– Intraperitoneal
i.e	– Isto é
i.m	– Intramuscular
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	– Índice de massa corporal
IP1	– Peptídeo interino 1
IT	– Índice térmico
ITTi	– Teste de tolerância intraperitoneal à insulina
JAK	– Janus quinase
Kg	– Quilograma
K_{ITT}	– Taxa de decaimento da glicose
LCRF	– Fator liberador de CCK luminal
LDL-c	– Proteína de baixa densidade
LF	– <i>Low fat</i>
LH	– Hipotálamo lateral
LPL	– Lipase lipoprotéica
M	– Mol
MC3R	– Receptor de melanocortina 3
MC4R	– Receptor de melanocortina 4
MCH	– Hormônio concentrador de melanina
Mg	– Miligrama
min	– Minutos
mL	– Mililitro
mm	– milímetro
mMol	– Milimol
mRNA	– Ácido ribonucleico mensageiro
NE	– Noradrenalina
NN	– Ninhada normal

NPY	– Neuropeptídeo Y
NR	– Ninhada reduzida
NTS	– Núcleo do trato solitário
OB-RB	– Receptor de leptina
OLETF	– <i>Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty</i>
p.c	– Peso corporal
PBS	– Tampão fosfato-salina
PC 1/3	– Pró-hormônio convertase 1 e 3
PC 2	– Pró-hormônio convertase 2
PI3K	– Fosfoinositol quinase 3
pM	– PicoMol
PND	– Dia pós natal
POF	– Pesquisa de orçamento familiar
POMC	– Proopiomelancortina
PP	– Polipetídeo pancreático
PVN	– Núcleo paraventricular
PYY	– Peptídeo YY
SNC	– Sistema Nervoso Central
SNS	– Sistema Nervoso Simpático
SOCS3	– Supressor da sinalização de citocinas 3
STAT	– Sinal transdutor e ativador de transcrição
TAB	– Tabela
TGI	– Trato gastrointestinal
TNF-α	– Fator de necrose tumoral α
TyG	– Índice triglicérido-glicose
U/I	– Unidade internacional
UCP-1	– Proteína desaclopadora-1
v/v	– volume/volume
VL	– Ventrículo Lateral
VLDL-c	– Proteína de muito baixa densidade
VMH	– Hipotálamo ventromedial

vs	– Versus
WAT	– Tecido adipose branco
WHO	– Organização Mundial de Saúde
X	– Vezes
Y1	– Receptor de NPY
α-MSH	– Hormônios estimulador de melanócito α
μg	– micrograma
μL	– Microlitro
\pm	– Mais ou menos
$^{\circ}$C	– Graus celsius
%	– por cento
α	– Alfa
β	– Beta
>	– maior
<	– menor
=	– igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	BALANÇO ENERGÉTICO	26
2.2	SUPERALIMENTAÇÃO NEONATAL	39
3	JUSTIFICATIVA	45
4	OBJETIVOS	46
4.1	OBJETIVO GERAL	46
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
5	MATERIAIS E MÉTODOS	47
5.1	ANIMAIS	47
5.2	PADRONIZAÇÃO DE NINHADA	47
5.3	CIRURGIAS	48
5.3.1	<i>Canulação da veia jugular</i>	48
5.3.2	<i>Probe de telemetria</i>	48
5.3.3	<i>Estereotaxia</i>	49
5.4	CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE NA FASE ADULTA	50
5.4.1	<i>Índice de Lee</i>	50
5.4.2	<i>Quantificação da adiposidade abdominal e histologia de tecido adiposo</i>	51
5.4.3	<i>Dosagens bioquímicas e hormonais</i>	51
5.5	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E À INSULINA	52
5.6	AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR	53
5.7	RESPOSTA TERMOGÊNICA À NORADRENALINA (NE)	53
5.8	AVALIAÇÃO DO ESVAZIAMENTO GÁSTRICO	54
5.9	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA c-FOS	54
5.10	<i>DESIGN</i> EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO <i>GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 (GLP-1)</i> E DA COLECISTOCININA- 8 (CCK-8) EM RATOS NN E NR	56
5.10.1	<i>Efeito do GLP-1 sobre a ingestão alimentar, glicemia e insulinemia</i> .	57

5.10.2	<i>Efeito do GLP-1 sobre a ativação de áreas encefálicas</i>	58
5.10.3	<i>Efeito do GLP-1 sobre a temperatura corporal</i>	58
5.10.4	<i>Efeito da CCK-8 sobre a ingestão alimentar</i>	58
5.10.5	<i>Efeito da CCK-8 sobre o esvaziamento gástrico</i>	59
5.10.6	<i>Efeito da CCK-8 sobre a ativação de áreas encefálicas</i>	59
5.10.7	<i>Efeito da CCK-8 sobre a temperatura corporal</i>	60
5.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
6	RESULTADOS	61
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE	61
6.1.1	<i>Ganho de peso</i>	61
6.1.2	<i>Índice de Lee e adiposidade</i>	62
6.1.3	<i>Dosagens bioquímicas e hormonais</i>	63
6.2	TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE (GTT _o)	63
6.3	TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À INSULINA (ITT _i) .	65
6.4	INGESTÃO ALIMENTAR	66
6.5	RESPOSTA TERMOGÊNICA À NORADRENALINA (NE)	67
6.6	GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 (GLP-1)	68
6.6.1	<i>Efeito do GLP-1 sobre a ingestão alimentar, glicemia e insulinemia</i> ..	68
6.6.2	<i>Efeito do GLP-1 sobre a ativação de áreas encefálicas</i>	70
6.6.3	<i>Efeito do GLP-1 sobre a temperatura corporal</i>	75
6.7	COLECISTOCININA-8 (CCK-8)	76
6.7.1	<i>Efeito da CCK-8 sobre a ingestão alimentar</i>	76
6.7.2	<i>Efeito da CCK-8 sobre o esvaziamento gástrico</i>	78
6.7.2	<i>Efeito da CCK-8 sobre a ativação de áreas encefálicas</i>	79
6.7.3	<i>Efeito da CCK-8 sobre a temperatura corporal</i>	84
7	DISCUSSÃO	86
8	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	100
	ANEXOS	116

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é um fenômeno mundial que tem atingido um grande número de indivíduos, independente de gênero, raça, idade e classe social. Quanto mais prevalente se torna a obesidade, maior é o estímulo para avaliar grupos populacionais mais suscetíveis, como crianças e adolescentes que chamam a atenção por manterem o padrão obeso na vida adulta (ALVES et al., 2004; FISBERG, 2004; TASSITANO et al., 2009).

O excesso de peso e as alterações metabólicas associadas tem alcançado níveis epidêmicos em nossa sociedade e representam um crescente problema de saúde pública em crianças e adultos. O peso corporal depende do equilíbrio entre a ingestão e o gasto calórico, bem como de ações hormonais, neurais, genéticas, da microbiota, entre outros. A obesidade se desenvolve quando a ingestão excede o gasto e há um acúmulo excessivo de gordura nos tecidos periféricos, como o tecido adiposo branco (WAT), fígado e músculo (FAROOQI; O'RAHILLY, 2007; FLIER, 2004; FRIEDMAN, 2003;).

A má nutrição durante períodos críticos de desenvolvimento, tanto no útero como na fase pós-natal, é um fator de risco sugerido para a obesidade e distúrbios metabólicos associados na vida adulta, possivelmente afetando o desenvolvimento normal dos circuitos neuronais que regulam o balanço energético (GALJAARD; DEVLIEGER, VAN ASSCHE, 2013; HALES; BARKER, 1992; McMILLEN; ROBINSON, 2005; PLAGEMANN, 1992;). As ideias de Hales e Barker estão diretamente ligadas ao conceito de programação: um processo pelo qual um estímulo ou insulto durante um período crítico de desenvolvimento tem consequências duradouras ou ao longo da vida (HALES, BARKER, 1992). Uma vez que esta hipótese foi proposta, muitos estudos em todo o mundo demonstram que fatores ambientais como a nutrição fetal e neonatal durante os períodos perinatais críticos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da obesidade e patologias metabólicas associadas, como doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (LÓPEZ et al., 2005; PLAGEMANN, 2006a e b).

Um modelo clássico de programação nutricional neonatal é a manipulação do tamanho da ninhada nos primeiros dias de vida. Ratos submetidos à restrição do número por ninhada (NR) ganham mais peso do que os ratos que crescem em ninhadas normais (NN). Os ratos NR exibem excesso de peso, hiperleptinemia, hiperinsulinemia, tolerância à glicose diminuída e aumento da pressão arterial sistólica. O aspecto chave desse modelo é que esses ratos mantêm o fenótipo obeso e os distúrbios metabólicos associados ao longo de suas vidas (LÓPEZ et al., 2005; LUCAS, 1998; PLAGEMANN et al., 1992). Quanto ao comportamento hiperfágico, existem várias discrepâncias na literatura (DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2002; PLAGEMANN et al., 1999c e d). Os dados sugerem que outros componentes envolvidos na homeostase energética, como alterações na eficiência metabólica, adipogênese ou gasto de energia podem estar modificados em ratos adultos de NR. A literatura também sugere que a ingestão energética excessiva nos períodos neonatais tem forte impacto nos mecanismos e circuitos hipotalâmicos que regulam a ingestão de alimentos, um passo fundamental no desenvolvimento da obesidade (PLAGEMANN, 2006; PLAGEMANN et al., 2000).

Até o presente momento, ainda não se conhecem precisamente os mecanismos que induzem a obesidade, todavia há um consenso científico de que o padrão genético, hábitos alimentares e o sedentarismo, em conjunto ou separadamente atuam diretamente para o estabelecimento desse quadro (LACLAUSTRA; CORELLA; ORDOVAS, 2007; STOLAR, 2007). Vários hormônios envolvidos na regulação do peso corporal, como insulina, leptina e grelina (BOURET, 2013; BOUREY; SIMERLY, 2004, 2006; DAVIDOWA; ZISKA; PLAGEMANN, 2004; STECULORUM; BOURET, 2011), exercem funções neurotróficas no hipotálamo, modulando a plasticidade neuronal, porém pouco se sabe sobre o papel da colecistocinina-8 e do *glucagon-like peptide-1* nesse processo. A contribuição individual desses sinais continua a ser estabelecida, mas parece que eles agem de maneira muito precisa e orquestrada. Investigações atuais e futuras irão penetrar nos mecanismos moleculares subjacentes da obesidade e da síndrome metabólica, auxiliando a identificação de novos alvos nutricionais e farmacológicos para estratégias de tratamento a fim de combater as consequências da obesidade humana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Obesidade na infância é encarada como uma patologia nutricional séria, que vêm aumentando de forma alarmante não só na sociedade brasileira atual, mas a nível mundial. Além disso, o excesso de peso está alcançando índices preocupantes no que concerne à saúde pública, com alta prevalência e forte impacto na vida das crianças, com consequências físicas, sociais, econômicas e psicológicas (MELLO et al., 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a prevalência mundial da obesidade mais do que duplicou entre 1980 e 2014. Em 2014, estimou-se que 41 milhões de crianças menores de 5 anos tinham excesso de peso ou estavam obesas. Se as tendências atuais continuarem, o número de crianças com sobrepeso ou obesas aumentará para 75 milhões até 2025 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

No Brasil, os inquéritos populacionais têm registrado um alarmante aumento na incidência de obesidade infantil nas últimas três décadas. De acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009), 33.5% das crianças de cinco a nove anos apresentam excesso de peso. A prevalência de excesso de peso em crianças nessa faixa etária oscilou de 25 a 30% nas regiões Norte e Nordeste (mais do que cinco vezes a prevalência de déficit de peso), e de 32 a 40% nas regiões Sudeste, Sul e Centro Oeste. Os estudos mostram também que, apesar da desnutrição ainda ser uma triste realidade no Brasil, há pelo menos 11,3 milhões de brasileiros acima do peso adequado (IBGE, 2011).

Quanto mais prevalente se torna a obesidade, maior é o estímulo para avaliar grupos populacionais mais suscetíveis, como crianças e adolescentes que chamam a atenção por manterem o padrão obeso na vida adulta (ALVES et al., 2004; FISBERG, 2004; TASSITANO et al., 2009). As estimativas mostraram que o risco de obesidade tardia foi duas vezes maior para crianças obesas do que para crianças não obesas (EBBELING; PAWLAK; LUDMIG, 2002).

A obesidade na infância está associada com uma ampla gama de complicações graves de saúde e um risco aumentado de início prematuro de doenças, incluindo diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão, puberdade precoce, irregularidades menstruais, síndrome do ovário policístico, esteatose hepática, apneia do sono, asma, hipertensão

intracraniana benigna, distúrbios musculoesqueléticos e problemas psicológicos. Recentemente, também tem sido associada ao aumento da mortalidade na idade adulta (LAKSHMAN; ELKS; ONG, 2012; REILLY et al., 2003; TWIG et al., 2016).

Todos os aspectos do ambiente no qual as crianças são concebidas, nascidas e criadas podem contribuir para o risco de se tornarem obesas ou com excesso de peso. Durante a gravidez, diabetes gestacional e obesidade materna podem resultar em aumento do peso ao nascer e risco de obesidade mais tarde na vida (ALFARADHI; OZANNE, 2001; OJHA et al., 2013). O mesmo pode ser observado quando há superalimentação na fase pós-natal imediata (PLAGEMANN, 2005a). Escolher alimentos saudáveis para bebês e crianças pequenas é fundamental, porque as preferências alimentares são estabelecidas no início da vida. Alimentação precoce com alto teor de energia, gordura, açúcar e sal é um dos principais contribuintes para a obesidade infantil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Sobrepeso e obesidade são em grande parte evitáveis. Políticas de apoio, ambientes de convívio, escolas e comunidades são fundamentais na definição das escolhas dos pais e das crianças, tornando a escolha saudável de alimentos e atividade física regular uma escolha mais fácil (disponível e acessível), que contribui para o controle do excesso de peso (IBGE, 2011).

2.1 BALANÇO ENERGÉTICO

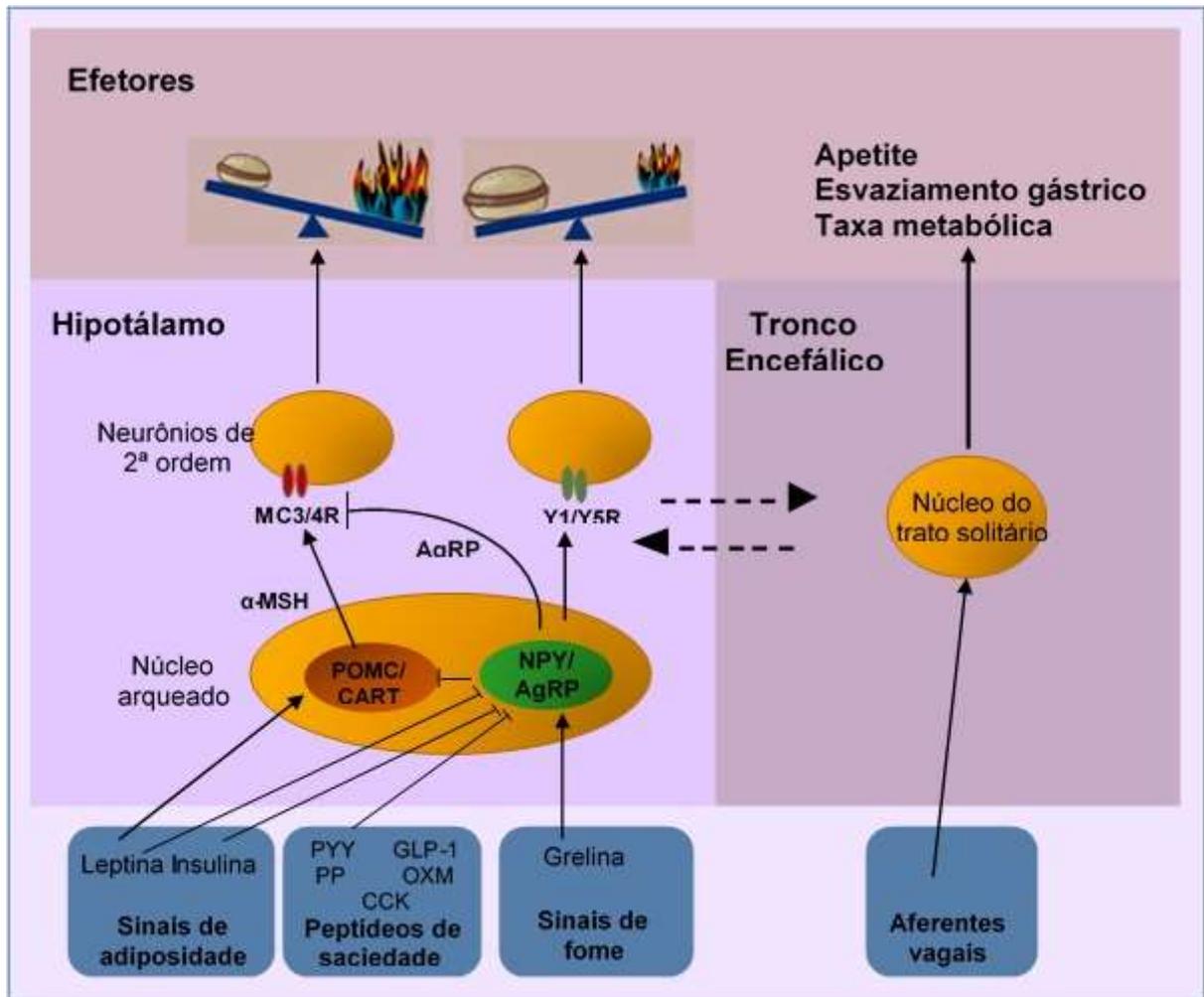
A obesidade é uma doença multifatorial crônica de etiologia complexa, decorrente do desbalanço crônico entre consumo de energia e gasto energético, envolvendo fatores genéticos, ambientais, de estilo de vida e emocionais (MOEHLECKE et al., 2016). Normalmente, o balanço energético está muito bem regulado, tanto a curto como a longo prazo. No entanto, em alguns indivíduos há um desequilíbrio entre o consumo e a demanda de energia resultando em ganho de peso e, em última instância, obesidade (NÄSLUND; HELLSTRÖM, 2007).

A regulação da homeostase energética ocorre através da interconexão entre uma grande variedade de sinais do trato gastrointestinal (TGI), vias aferentes sensoriais ou através da circulação e do complexo vagal dorsal para múltiplos circuitos

cerebrais para atuar em vias neuronais autonômicas e órgãos endócrinos (SHIN; ZHENG; BERTHOUD, 2009). Essa interação resultará no controle do apetite, na saciedade (definida como sensação de satisfação ou plenitude) e no prazer associado ao alimento, relacionado à palatabilidade e recompensa derivada do alimento (SAPER; CHOU; ELMQUIST, 2002).

Peptídeos produzidos na periferia alcançam os centros cerebrais envolvidos no controle central do apetite e da saciedade através do eixo intestino-cérebro e atingem núcleos hipotalâmicos pelo cruzamento da barreira hematoencefálica ou uma ação via nervo vago para atingir o tronco encefálico. Quando sinais periféricos anorexigênicos atingem o núcleo arqueado (ARC), ativam neurônios contendo proopiomelanocortina (POMC) e transcritos relacionados à cocaína e anfetamina (CART) e desativam neurônios orexigênicos contendo neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao agouti (AgRP). A ativação de neurônios POMC/CART leva à uma ativação de receptores de melanocortina 3 e 4 (MC3R/MC4R) no núcleo paraventricular (PVN) e no hipotálamo lateral (LH), o que provoca saciedade e aumento da taxa metabólica. O MC4R também é expresso no núcleo do trato solitário (NTS), que também contém neurônios POMC e assim podem modular indiretamente a ingestão alimentar (SCHWARTS et al., 2000). Sinais orexígenos são disparados pela grelina, que ativa neurônios contendo NPY/AgRP e desativa neurônios contendo POMC/CART no ARC. NPY estimula o apetite por ativar seu receptor (Y1) no PVN, enquanto que o AgRP aumenta o apetite atuando como um antagonista do receptor de melanocortina 3 e 4. Além disso, o NPY também pode atuar no NTS para estimular o apetite (Figura 1). Tomados em conjunto, os sinais periféricos e centrais estão envolvidos na orquestração da ingestão de alimentos. Enquanto os transmissores periféricos atingem o cérebro através da barreira hematoencefálica ou do nervo vago e modulam a atividade neuronal, os núcleos cerebrais também liberam transmissores peptidérgicos tais como oxitocina ou fator de libertação de corticotropina que afetam os locais de ligação periférica, ao nível do nervo entérico, a fim de modular a ingestão de alimentos (CAMILLERI, 2006).

Figura 1. Representação simplificada da ação de peptídeos intestinais no hipotálamo.



Fonte: Modificado de Badman e Flier, 2005.

Nota: O acesso aos agentes circulantes no núcleo arqueado do hipotálamo é facilitado pela barreira hematoencefálica. A integração de sinais periféricos dentro do cérebro envolve interação entre as estruturas do hipotálamo e do cérebro posterior, incluindo o NTS, que recebe entradas aferentes vagais. MCR3/4R, Receptores de melanocortina 3 e 4; POMC, pró-opiomelanocortina; CART, transcrito relacionado à cocaína e anfetamina; NPY, neuropeptídeo Y; AgRP, peptídeo relacionado ao agouti; Y1/Y5R, receptor NPY 1 e 5; PYY, peptídeo tirosina tirosina; GLP-1, *glucagon-like peptide 1*; PP, polipeptídeo pancreático; CCK, Colecistocinina; OXM, oximodulina. , → , estimulação direta; --|, inibidor direto; --->, vias indiretas.

A regulação da ingestão alimentar parece envolver mecanismos duais. Hoje, reconhece-se que o controle a curto prazo da ingestão de alimentos envolve não apenas o SNC, mas também as suprarrenais, pâncreas e o TGI. Além disso, verificou-se que o tecido adiposo tem um papel importante na regulação a longo prazo da ingestão produzindo vários mediadores endócrinos e parácrinos, que são capazes de influenciar a ingestão de alimentos (NÄSLUND; HELLSTRÖM, 2007).

O controle a longo prazo da ingestão é de origem metabólica onde a ação endócrina do tecido adiposo entra em foco, liberando hormônios na periferia que atuam em centros cerebrais que regulam o apetite e o metabolismo (NÄSLUND; HELLSTRÖN, 2007). O tecido adiposo é o maior reservatório de energia do corpo. Evidências recentes demonstraram que esse tecido também desempenha um papel importante na integração de sinais endócrinos, metabólicos e inflamatórios que controlam a homeostase energética, através da produção de uma variedade de proteínas bioativas, denominadas conjuntamente "adipocinas": a) proteínas relacionadas à resposta imunológica - interleucina 6; b) fatores de crescimento - fator transformador de crescimento β ; proteínas da via alternativa do sistema complemento (adipsina). Existem ainda adipocinas envolvidas no controle da pressão arterial (angiotensinogênio); na coagulação sanguínea 1 (inibidor do ativador de plasminogênio); controladores da homeostase glicêmica (adiponectina, resistina, visfatina, leptina); substâncias envolvidas com a angiogênese - fator de crescimento endotelial vascular 3, dentre várias outras (MOEHLECKE et al., 2016).

Nos mamíferos, ocorrem dois tipos de tecido adiposo: branco e marrom, diretamente regulados pelo sistema nervoso autônomo. Enquanto o tecido branco (WAT) tem como função principal o armazenamento de energia, atuando como sistema tampão mais importante para o equilíbrio de energia lipídica, além da secreção de leptina, o tecido adiposo marrom (BAT) relaciona-se com a resposta térmica do corpo. O BAT, especializado na produção de calor (termogênese) está menos presente em humanos adultos, mas é encontrado em maior proporção no nascimento. Os adipócitos marrons, com diâmetro médio, são menores do que os adipócitos brancos de tecido adiposo branco. Eles têm gotas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos, citoplasma relativamente abundante, um núcleo esférico e ligeiramente excêntrico e numerosas mitocôndrias que, por não possuírem o complexo enzimático necessário para a síntese de ATP, utilizam a energia liberada pela oxidação de metabólitos, principalmente ácidos graxos, para gerar calor. O citosol dessas células apresenta várias inclusões lipídicas e seu aspecto marrom deve-se à grande presença de citocromo oxidase em suas células. A geração de calor pelo BAT é possível graças a uma proteína denominada proteína desacopladora (UCP) ou

termogenina. Essa proteína compõe uma família de proteínas bombeadoras de prótons localizadas na membrana mitocondrial interna e têm função de translocação dos prótons e elétrons do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial, dissipando o gradiente de prótons através da membrana interna da mitocôndria e gerando calor ao invés de ATP (COELHO; OLIVEIRA; FERNANDES, 2013; WOZNIAK et al., 2009).

A regulação do metabolismo do tecido adiposo ocorre por meio de nutrientes e sinais aferentes dos sistemas neurais e hormonais, conforme as necessidades energéticas de cada indivíduo. O sistema nervoso autônomo tem controle direto sobre o tecido adiposo através de seus componentes simpático (SNS) e parassimpático. A inervação simpática relaciona-se principalmente com as ações catabólicas, tais como a lipólise mediada pelos receptores β -adrenérgicos (Adr- β) e dependente da atividade da enzima lipase hormônio sensível. Por outro lado, o sistema nervoso parassimpático está envolvido na execução de efeitos anabólicos sobre os depósitos adiposos, como a captação de glicose e de ácidos graxos estimulada pela insulina (FONSECA-ALANIZ et al., 2006, MOEHLECKE et al., 2016). A modulação do fluxo simpático e parassimpático fornece um mecanismo homeostático complexo que permite regular especificamente a interferência funcional de órgãos envolvidos no equilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético (VILLARROYA; VIDAL-PUIG, 2013).

É importante destacar o papel da composição da dieta na resposta simpática, tendo em vista a função potencial da reatividade adrenérgica na patogênese da obesidade e da síndrome metabólica. Em roedores, uma dieta rica em gordura e exposição ao frio geram resposta termogênica adaptativa no BAT, diminuindo ou aumentando, respectivamente, o fluxo simpático para estimular/inibir o depósito de gordura no WAT (BRITO; BRITO; BARTNESS, 2008). A restrição calórica, por sua vez, gera uma diminuição do fluxo simpático para BAT, resultando em um gasto energético reduzido e um aumento simultâneo de fluxo para áreas específicas do WAT facilitando a mobilização lipídica. Já os sinais relacionados com a ingestão de alimentos de várias origens (por exemplo, intestino, área porta-hepática, barorreceptores) estão integrados no cérebro e resultam num fluxo de saída simpático periférico aumentado (MESSINA et al., 2017; VAN BAAK, 2008). É bem conhecido,

em animais, que a hiperresponsividade simpática crônica está presente na obesidade central. O aumento da reatividade simpática também pode estar envolvido no declínio da sensibilidade à insulina, na determinação de um ciclo vicioso responsável pela hipertensão e no desenvolvimento da síndrome metabólica (SMITH; MINSON, 2012).

O tecido adiposo ainda modula os níveis circulantes de insulina e leptina, em proporção à sua massa, contribuindo com a regulação a longo prazo do equilíbrio energético. A insulina é sintetizada nas células β do pâncreas e secretadas rapidamente após a uma refeição. Uma vez na circulação, ela cruza a barreira hematoencefálica e atua no ARC onde seus receptores são altamente expressos (SUZUKI et al., 2010). Administração intracerebroventricular (i.c.v) de insulina resulta em supressão da ingestão alimentar dose-dependente e do ganho de peso corporal em roedores (PORTE JR.; WOODS, 1981). Além disso, a administração central de insulina suprime o aumento de mRNA de NPY induzido em jejum (SCHWARTZ et al., 1992) e aumenta a expressão de mRNA POMC (BENOIT et al., 2002) e induz saciedade. Administração de drogas que reduzam o número de receptores de insulina no ARC leva à hiperfagia e aumento da massa gorda em ratos (OBICI et al., 2002).

A leptina, por sua vez, é secretada por adipócitos e tem níveis circulantes proporcionais à massa gorda. Esse hormônio é transportado através da barreira hematoencefálica por um sistema saturável e também exerce seu efeito anoréxico através do ARC, inibindo neurônios NPY/AgRP e ativando neurônios POMC/CART, culminando na redução do consumo de alimentos e aumento do gasto energético (SAHU 2003). Entre os três tipos de receptores de leptina, o receptor, Ob-Rb que é altamente expresso no hipotálamo, é pensado ser o receptor principal envolvido na regulação do apetite. Camundongos ob/ob, deficientes em leptina, tem hiperfagia e obesidade e isso pode ser revertido pelo tratamento com leptina (HALAAS et al., 1995). Em crianças obesas com deficiência congênita de leptina, administração subcutânea desse hormônio reduz a massa gorda, a hiperinsulinemia e a hiperlipidemia (FAROOQI et al., 2002).

O controle a curto prazo da ingestão é primariamente regulado por vias de sinalização emanando do TGI que são capazes de afetar os centros cerebrais envolvidos no controle central da fome e da saciedade através do eixo intestino-

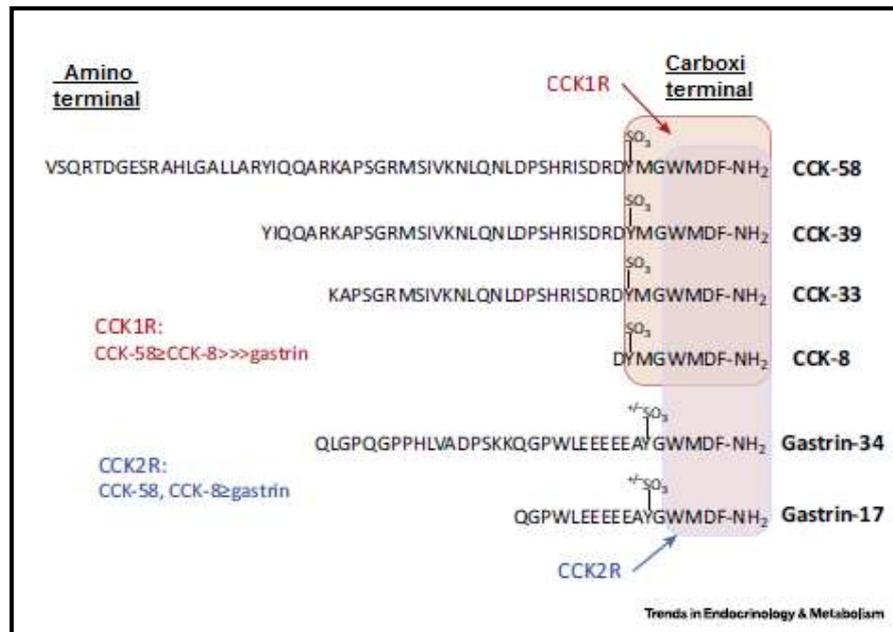
cérebro. Esse eixo envolve o cruzamento da barreira hematoencefálica rumo ao ARC do hipotálamo ou uma ação via nervo vago para atingir o NTS no tronco encefálico (SCHWARTS et al., 2000). É de notar que estas 2 vias não estão separadas entre si, mas sim interligadas por uma rede de neurônios e fibras nervosas que conectam o NTS e o núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo (PRINZ; STENGEL, 2017).

Vários peptídeos são derivados do TGI e estimulam a saciedade, como a colecistocinina (CCK), *glucagon-like peptide 1* (GLP-1), peptídeo tirosina-tirosina (PYY) 2 e a recentemente descoberta nesfatina-1. Apenas um peptídeo produzido periféricamente tem ação central e é conhecido por estimular o apetite, a grelina (PRINZ; STENGEL, 2017).

Os hormônios liberados do TGI ou do tecido adiposo tem sido apontados como possíveis responsáveis por distúrbios metabólicos observados na obesidade, seja por causa de sua ação sobre a ingestão de alimentos como saciedade ou sinais de fome, seja por efeitos sobre a secreção de insulina a partir do pâncreas a fim de garantir a homeostase glicêmica (MADSBAD, 2014). No presente trabalho dá-se destaque à dois peptídeos anorexigênicos: CCK-8 e GLP-1.

A CCK é um peptídeo tipo gastrina, encontrado ao longo do cérebro e TGI nos quais atua como molécula sinalizadora. No trato gastrointestinal, CCK é localizada principalmente nas células 'I' da mucosa duodenal e jejunal e é liberada em resposta à presença de nutrientes, particularmente os produtos da digestão de gordura e proteína, mas também pela glicose. CCK também está presente em neurônios aferentes vagais entéricos onde atua como neurotransmissor (MORAN, 2000). No SNC, a CCK encontra-se no tronco encefálico caudal e hipotálamo (BALLAZ, 2016). Existem várias formas biologicamente ativas, classificadas de acordo com o número de aminoácidos que contêm - CCK-5, CCK-8, CCK-22, CCK-33, CCK-39, CCK-58 e CCK-83 e derivadas de um peptídeo precursor de 95 aminoácidos (Figura 2). CCK-8 é a forma mais abundante no cérebro humano, enquanto que no intestino humano e circulação CCK-58, CCK-33, CCK-22 e CCK-8 estão presentes em quantidades significativas (MILLER; DESAI, 2016).

Figura 2. Formas bioativas da colecistocinina (CCK) e sua relação com receptor do tipo 1 (CCK1R) e do tipo 2 (CCK2R).



Fonte: Modificado de Miller e Desai, 2016.

Nota: São mostradas as formas de ocorrência natural dos peptídeos de CCK e gastrina partilhando sequências carboxi-terminal. Destaque em azul e vermelho, respectivamente, são os fragmentos mínimos necessários e suficientes para a ligação de alta afinidade e potentes respostas biológicas a CCK2R e CCK1R.

A liberação da CCK é mediada por uma 'fator liberador de CCK luminal' (LCRF), que é secretado pela mucosa duodenal e pelas células pancreáticas. Após ingestão de uma refeição, nutrientes presentes no intestino delgado estimulam um aumento das concentrações plasmáticas de CCK de ~1pM para ~5-8pM, com níveis aumentando rapidamente e atingindo o pico em 15 minutos e diminuindo gradualmente durante 3-5h (LITTLE; HOROWITZ; FEINLE-BISSET, 2005). Esse hormônio exerce sua ação através de 2 subtipos de receptores acoplados a proteína G que ligam-se aos peptídeos sulfatados, o receptor 1 ou A (alimentar) e 2 ou B (cerebral). O receptor CCK1 (CCK1R) liga especificamente as formas de CCK que são sulfatadas na tirosina na posição 7 e são encontrados em altas concentrações nos tecidos periféricos, ácinos pancreáticos, vesícula biliar, músculo liso pilórico e nervos aferentes entéricos vagais. O CCK1R é também localizado no SNC, particularmente nas regiões de regulação da ingestão de alimentos, incluindo o NTS, a área postrema

(AP) e hipotálamo dorsomedial (DMH). O receptor CCK2 (CCK2R) é idêntico ao receptor de gastrina e está presente no SNC, incluindo o córtex cerebral e o hipotálamo, bem como nos aferentes vagais e na mucosa gástrica. O CCK2R tem uma elevada afinidade para formas de CCK, tais como CCK-8 sulfatada (CCK-8S), bem como CCK-8 não-sulfatada, CCK-5 e também liga gastrina (HILL et al., 1987, SAYEGH, 2013). A colecistocinina tem um grande número de ações biológicas dentro do trato gastrointestinal, incluindo a estimulação da contração da vesícula biliar e da secreção pancreática, inibição da secreção de ácido gástrico, retardo do esvaziamento gástrico, modulação do intestino delgado, motilidade colônica e supressão da ingestão energética (SAYEGH, 2013).

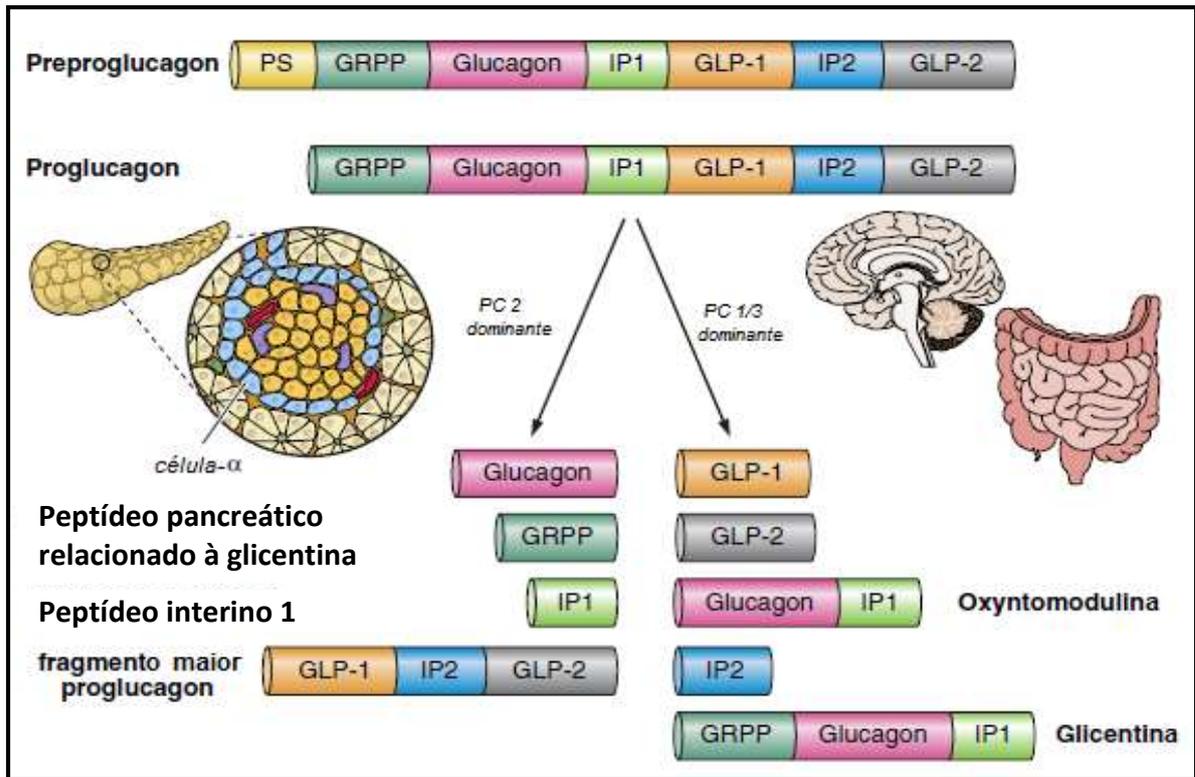
Com base na evidência de que a CCK desempenha um papel relevante na regulação do apetite e consumo de energia, tem sido sugerido que anormalidades na CCK ou em sua função gastrointestinal e no apetite podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção da obesidade. Relatos da literatura apoiam o papel potencial da CCK na obesidade, em estudos com animais. Ratos geneticamente desprovidos do receptor CCK1 funcionante rapidamente desenvolvem obesidade. Ratos *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty* (OLETF), que não possuem CCK1R como resultado de uma mutação, tornam-se marcadamente hiperfágicos e com sobrepeso já no início da vida. Os ratos OLETF consomem refeições muito maiores e são completamente resistentes aos efeitos inibitórios de CCK exógena, bem como da infusão de nutrientes gástricos ou intestinais (MORAN et al., 1998). O papel da CCK na patogênese da obesidade humana é menos definido. Nos seres humanos, polimorfismos na região promotora do gene que codifica o receptor CCK1 está associado a uma maior porcentagem de gordura corporal (FUNAKOSHI et al., 2000). No entanto, mutações no gene desse receptor parecem ser pouco frequentes em seres humanos (MILLER et al., 2002).

Em indivíduos obesos, as concentrações plasmáticas em jejum de CCK foram relatadas como aumentadas, em vez de diminuídas (BARANOWSKA et al., 2000). Um perfil semelhante foi observado em idosos, nos quais as concentrações de CCK plasmáticas em jejum estavam aumentadas e associadas à diminuição da fome (STURM et al., 2003), bem como um aumento da sensibilidade aos efeitos inibitórios

da CCK exógena na ingestão energética, quando comparados com indivíduos jovens saudáveis (MACINTOSH et al., 2001). Há informações limitadas sobre a liberação de CCK após ingestão de nutrientes na obesidade. Um estudo relatou que, após uma dieta de alto teor de gordura, a secreção de CCK foi maior em obesos do que em indivíduos magros, apesar de taxas comparáveis de esvaziamento gástrico. Como indivíduos obesos comumente consomem uma dieta rica em gordura, a exposição do intestino a estes nutrientes que estimulam a liberação de CCK poderia explicar este aumento nas concentrações plasmáticas desse peptídeo (LITTLE; HOROWITZ; FEINLE-BISSET, 2005).

O GLP-1 é um polipeptídeo de 31 aminoácidos derivado do processamento pós-traducional do proglucagon (peptídeo de 160 aminoácidos) pela enzima prohormônio convertase 1 (PC1/3). A expressão gênica do proglucagon periférico foi localizada nas células 'L' enteroendócrinas e nas células α -pancreáticas, enquanto que os neurônios que expressam o proglucagon centralmente foram localizados em regiões do tronco cerebral como o núcleo do trato solitário. Ao fim do processamento produz-se 2 formas biologicamente ativas, o GLP-1 (7-36) amida e GLP-1 (7-37), sendo a primeira a principal forma circulante em seres humanos (SANDOVAL; D'ALESSIO, 2015) (Figura 3).

Figura 3. Processamento pós-translacional do preproglucagon.



Fonte: Modificado de Sandoval e D'Alessio, 2015.

Nota: Esse gene codifica o proglucagon, um peptídeo que é diferencialmente processado com base na atividade das pro-hormônio convertases 1/3 e 2. Nas células das ilhotas pancreáticas, a pro-hormônio convertase 2 (PC2) predomina e o glucagon, o polipeptídeo pancreático relacionado com glicentina (GRPP), peptídeo interino 1 (IP1) e um fragmento maior de proglucagon. Nas células L do intestino e em neurônios específicos do SNC, a pro-hormônio convertase 1 (PC1/3) é relativamente maior e o proglucagon é clivado em *glucagon-like peptide 1* e 2 (GLP-1 e GLP-2), oxintomodulina, glicentina e IP2.

Este hormônio tem papel proeminente na homeostase da glicose, motilidade gastrointestinal, apetite e funções adicionais além dos comportamentos ingestivos. Sua secreção ocorre em resposta a nutrientes intraluminais, mas também foram relatados aumentos em decorrência de estímulos céfálico e aumentos antecipados à refeição. No que se refere aos nutrientes, há dois picos na secreção de GLP-1 que são vistos em resposta a ingestão de alimentos em seres humanos. O primeiro pico ocorre dentro de 15 minutos após o início da refeição, antes que os nutrientes possam acessar as células L mais baixas no intestino. Este aumento rápido nos níveis de GLP-1 parece envolver um circuito neuroendócrino onde os nutrientes no estômago ou no intestino proximal estimulam a liberação de hormônios, tais como o peptídeo inibitório

gástrico e o peptídeo liberador de gastrina, que atuam através de vias vagais para estimular células L a secretar GLP-1. O segundo pico ocorre mais tarde, 30-60 min após a ingestão de alimento, é maior e pensa-se derivar do contato direto dos nutrientes com as células L intestinais, com subsequente despolarização ou ativação de sistemas de segundo mensageiro. Deste modo, os nutrientes no TGI têm a capacidade de estimular a secreção de GLP-1 direta e indiretamente através de mecanismos hormonais e neurais (HERRMANN et al., 1995).

Após a secreção, o GLP-1 entra nos capilares e é rapidamente degradado pela dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), uma enzima expressa nas paredes capilares e por todo o corpo. Estima-se que apenas 25% do GLP-1 secretado atinja o fígado através da veia porta hepática. É possível, no entanto, que GLP-1 possa atuar sobre seu receptor em aferentes vagais na lâmina própria ou nervos entéricos na parede intestinal, antes de entrar nos capilares. Também pode ser possível que aumentos maiores e mais longos de GLP-1 possam saturar a DPP-IV disponível e permitir que mais GLP-1 entre em circulação geral. Se o GLP-1 sobreviver à degradação da DPP-IV, é possível que ele possa ativar o receptor central, porque este parece atravessar a barreira hematoencefálica por difusão simples (DAILEY; MORAN, 2013).

O GLP-1 estimula a liberação de insulina, inibe a liberação de glucagon, inibe esvaziamento, i.e., contribui para o mecanismo de freio ileal. Além disso, esse peptídeo está envolvido no aprendizado e memória, neuroproteção, redução da ingestão alimentar e aumento da atividade do tecido adiposo marrom (elevando o gasto energético), que poderia ser potencialmente um mecanismo pelo qual há perda de peso (HEPPNER; PEREZ-TILVE, 2015; PUNJABI et al., 2011). Administração de GLP-1 ou de análogos de longa duração naturais ou sintéticos, tais como exendina-4 (Ex-4) e liraglutida, inibe a ingestão de alimentos em muitas espécies, incluindo seres humanos (REIDELBERGER et al., 2011; SCOTT et al., 2007; STEINERT et al., 2010), reduzem o peso e melhoram o metabolismo da glicose em indivíduos com sobrepeso, o que transformou-o em uma opção terapêutica para o sobrepeso e diabetes tipo 2 (ANANDHAKRISHNAN; KORBONITS, 2016).

As ações de GLP-1 são mediadas pela ativação de um receptor acoplado à proteína G (GLP-1R), que é expresso em toda a periferia (isto é, nervos entéricos,

nervos vagais, pâncreas, estômago, intestino grosso e tecido adiposo) e no cérebro onde é encontrado em várias áreas do prosencéfalo, incluindo áreas que estão implicadas na ingestão de alimentos e no balanço energético, tais como a área postrema (AP), NTS, hipotálamo e amígdala (MERCHANTHALER; LANE; SHUGHRUE, 1999). Esses receptores são ativados por vários fatores que diminuem a ingestão de alimentos (componentes de bactérias tais como lipopolissacarídeo ou hormônios como CCK, leptina ou ocitocina). Além disso, o GLP-1R é expresso em aferentes vagais e seu efeito de saciedade é bloqueado por vagotomia. Tomados em conjunto, estes dados apontam para uma mediação do efeito de redução da ingestão de alimentos do GLP-1 por circuitos do nervo vago e do cérebro posterior, em vez do cruzamento pela barreira hematoencefálica. Isto é ainda apoiado por experimentos com lesões que demonstram que a ruptura das projeções do tronco encefálico para o hipotálamo reduzem o efeito de supressão do apetite do GLP-1 em ratos (ABBOTT et al., 2005). Além disso, tanto a administração periférica como central desse peptídeo induz c-Fos, um marcador para atividade neuronal, no PVN, enquanto que apenas a injeção central de GLP-1 induz c-Fos no ARC. A microinjeção de GLP-1 no ARC aumentou a secreção de secreção insulina estimulada pela glicose, enquanto a ingestão de alimentos foi reduzida por injeção de GLP-1 no PVN. Por fim, a administração de liraglutida (um análogo sintético do GLP-1) estimula diretamente neurônios contendo POMC/CART e inibe neurônios contendo NPY/ AgRP no ARC, resultando em diminuição do peso corporal (PRINZ; STENGEL, 2017).

Tendo em vista a atuação relevante do GLP-1 na homeostase energética, estudos demonstraram redução dos níveis plasmáticos de GLP-1 em obesos em comparação com indivíduos magros e que a secreção pós-prandial de GLP-1 parece ser inversamente proporcional ao IMC, ou seja os níveis plasmáticos de GLP-1 são atenuados nos obesos após uma refeição (MADSBAD, 2014; NÄSLUND; HELLSTRÖN, 2007). A causa para a redução nos níveis de GLP-1 na obesidade não foi determinada conclusivamente. Alguns dados sugerem que a secreção pode ser reduzida porque as células L são hiporresponsivas aos hidratos de carbono na obesidade. Esta deficiência pode ser devida à inibição da secreção por ácidos graxos livres circulantes. Há evidências de que a leptina potencializa os efeitos do GLP-1,

tanto a nível periférico como central, que pode ser importante para alcançar e manter a perda de peso na obesidade. A leptina atua no hipotálamo como um sinal de saciedade e seus níveis no plasma são diretamente proporcionais à gordura corporal. Conseqüentemente, na obesidade existem níveis cronicamente elevados de leptina que culminam com resistência à esse hormônio (BARRERA et al., 2011). Assim, a resistência à leptina pode contribuir para níveis reduzidos de GLP-1 na obesidade. Seja qual for a sua etiologia, comprometimento da secreção ou da atividade do GLP-1 pode fornecer base para explicar porque a perda de peso é muitas vezes difícil de alcançar e/ou manter para indivíduos obesos. Dado o papel do GLP-1 no esvaziamento gástrico, a ingestão de alimentos e controle de glicose no sangue, seu comprometimento poderia, em teoria, criar um ciclo vicioso em que o ganho de peso leva a deficiência de sua ação, hiperglicemia, ganho de peso adicional e assim por diante (MADSBAD, 2014).

Como elucidado acima, observa-se a importância da sinalização gástrica e intestinal para o cérebro na regulação da fome, saciedade e comportamento alimentar. A fim de controlar e reverter a atual pandemia de obesidade, o desenvolvimento de tratamento eficaz é urgentemente necessário. Maior compreensão da patogênese da obesidade e o papel destes hormônios intestinais na regulação do apetite é essencial. Elucidado o mecanismo pelos quais os hormônios intestinais contribuem para a perda de peso pode-se fornecer uma oportunidade real para desenvolver tratamentos bem sucedidos para indivíduos com sobrepeso e obesidade (SUZUKI et al., 2010).

2.2 SUPERALIMENTAÇÃO NEONATAL

Aspectos genéticos, maus hábitos alimentares e sedentarismo geralmente são reconhecidos como os principais fatores para a atual epidemia de obesidade no mundo. No entanto, o contínuo crescimento dessa patologia indica que outros fatores, ainda não evidenciados, desempenhariam um papel importante na gênese deste mal (HABBOU et al., 2013).

Condições desfavoráveis em períodos críticos de desenvolvimento, como a gestação e lactação, fases na qual ocorrem o desenvolvimento e maturação dos

sistemas que regulam o balanço energético, podem reprogramar o metabolismo e ajustá-lo nesta condição por toda a vida (BRUNTON et al., 2013). Um ambiente prejudicial durante tais períodos tem efeitos persistentes, enquanto que este mesmo ambiente fora destas janelas críticas somente induziriam mudanças reversíveis (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Entre os fatores de programação metabólicas estão: dieta, hormônios, estímulos físicos, como temperatura, ciclo circadiano e agentes estressores (DE MOURA; PASSOS, 2005; DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008).

Um dos primeiros trabalhos epidemiológicos a levantar a possibilidade de que os acontecimentos no início da vida humana podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de sobrepeso e doenças crônicas na idade adulta foi realizado por Barker na década de 1990. Em seu trabalho, ele mostrou que recém-nascidos com baixo peso ao nascer, devido à desnutrição durante a gravidez, eram mais propensos a desenvolver um fenótipo adulto de distúrbios como o excesso de peso e desordens cardiometabólicas (BARKER, 1995).

Atualmente é aceito que o ambiente nutricional ou hormonal durante os períodos embrionário e fetal desempenham um papel modulador essencial, à medida que orienta a expressão do genoma. No entanto, no período pós-natal imediato essa plasticidade genômica permanece, talvez a um nível inferior, tornando esse período também suscetível ao ambiente nutricional. Na maioria dos mamíferos, o desenvolvimento de vários órgãos não é completo no nascimento e continua durante o pós-parto imediato (GROVE; SMITH, 2003; KAUNG, 1994). Assim, estímulos de natureza física, mental ou nutricional poderiam influenciar a expressão genômica na prole, teoricamente para favorecer a adaptação ao seu ambiente. No entanto, a longo prazo, essas mudanças podem ser inadequadas e até mesmo prejudiciais, uma vez que podem predispor o organismo adulto a distúrbios metabólicos (HABBOUT et al., 2013).

Numerosos estudos demonstraram que o ambiente pós-natal precoce pode influenciar o peso corporal e homeostase energética na idade adulta. A superalimentação durante o período perinatal tem sido associada com a susceptibilidade ao excesso de peso, obesidade e comorbidades afins (HEIDEL;

PLAGEMANN, DAVIDOWA, 1999; MORRISON et al., 2008; PLAGEMANN et al., 1999a e b). Em roedores, a superalimentação precoce pode ser induzida pela redução do tamanho da ninhada, como demonstrado pela primeira vez por Kennedy em 1957. Neste contexto, os estudos pioneiros publicados na década de 1990 (HEIDEL; PLAGEMANN, DAVIDOWA, 1999; PLAGEMANN et al., 1999a e b) mostraram, em ratos, que a redução do número de filhotes (3-4 filhotes/mãe) após o nascimento levou a aumentos significativos na ingestão alimentar, devido à maior disponibilidade de leite materno no período pós-natal crítico imediato. Além disso, ratas lactantes amamentando ninhadas menores apresentam elevação do conteúdo de triglicerídeo no leite (CUNHA et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; VELKOSKA; COLE; MORRIS, 2005). Devido a este aumento no consumo calórico, roedores criados em ninhadas pequenas apresentam sobrepeso já ao desmame, mas os níveis podem variar entre as linhagens, origem geográfica e tamanho de 56% a 10% em ratos *Wistar* e *Sprague Dawley*, para quase 30% em camundongos (C57Bl/6 ou *Swiss*). No período pós-desmame, Habbout et al. (2012) demonstraram que roedores superalimentados neonatalmente mantiveram seu ganho de peso corporal ao longo da vida. A obesidade neonatal causada pela superalimentação resulta ainda em hiperfagia, aumento de gordura visceral, hiperleptinemia, hiperinsulinemia, hiperglicemia, resistência hipotalâmica a insulina e a leptina e maior adiposidade visceral já ao desmame (CONCEIÇÃO et al., 2011; PLAGEMANN et al., 1999c; RODRIGUES et al., 2011). Assim, o modelo de redução de ninhada torna-se útil para estudar as consequências do excesso de peso moderado a longo prazo em oposição aos modelos habituais de obesidade genética ou induzida por dieta.

De fato, vários modelos experimentais de obesidade em ratos e camundongos melhoraram consideravelmente nossa compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos cardiovascular e metabólico em consequências do excesso de peso (CARROLL; VOISEY; VAN DAAL, 2004). Alguns desses modelos genéticos correspondem a condições em que a obesidade é induzida por deficiência na sinalização de leptina, quer pela ausência total desse hormônio (rato *Zucker fa/fa*, camundongo *ob/ob*) ou o de seu receptor (camundongo *db/db*). Os roedores com alterações genéticas são fenotipicamente indistinguíveis dos seus irmãos não

afetados ao nascer, mas ganham peso rapidamente ao longo de suas vidas, alcançando um peso 3 vezes maior, que os caracteriza com um dos graus mais altos de obesidade em humanos. Entretanto, as formas monogênicas de obesidade em humanos são eventos muito esporádicos e são acompanhados por diversas anormalidades metabólicas, algumas vezes com consequências graves imediatas. Outro método para induzir sobrepeso em animais de experimentação é usar dietas enriquecidas com lipídios (*High fat diet* - HFD) ou carboidratos (*High Carb* – HC), que levam rapidamente ao maior ganho de peso corporal (2 vezes maior que dos controles). Da mesma forma, as condições deste ganho de peso induzido por dieta correspondem a graus severos de obesidade, mas provavelmente são pouco representativos de condições que levam ao sobrepeso simples. Ao contrário dos animais com obesidade induzida por dieta (hipercalórica, hiperglicídica e/ou hiperlipídica), os animais NR não tem o fenótipo revertido ao retornar a alimentação normal após o desmame (CONCEIÇÃO et al., 2011; HARIRI; THIBAUT, 2010; PLAGEMANN et al., 2006), reforçando a importância de estudar as possíveis alterações metabólicas e hormonais que seriam responsáveis pela manutenção desse perfil de sobrepeso induzido por superalimentação na infância.

Muita atenção tem sido voltada para a ingestão de alimentos e os mecanismos de regulação alimentar do hipotálamo, principalmente pela insulina e leptina, a fim de explicar como estes ratos provindos de ninhada reduzida mantem um fenótipo de sobrepeso ao longo da vida (COLLDEN et al., 2014; PLAGEMANN et al., 1999c; PLAGEMANN, 2006;). Vários grupos de pesquisa não têm notado diferenças na ingestão de alimentos entre ratos adultos criados em ninhadas grandes e pequenas (MOZES et al., 2004; SPENCER; TILBROOK, 2009; XIAO et al., 2007) e nos casos em que hiperfagia é relatada, é de curta duração (LOPEZ et al., 2007), e/ou pode ser atribuída ao maior tamanho do animal (RODRIGUES et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009). A redução do gasto energético pode também contribuir para a manutenção de um fenótipo com sobrepeso (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Há fortes indicações de que a capacidade do tecido adiposo interscapular marrom (BAT) para termorregular e, portanto, aumentar o gasto energético pode estar comprometido em indivíduos com excesso de peso. A infraregulação da função BAT tem sido observada

em vários modelos genéticos de obesidade, como camundongos ob/ob e db/db, que apresentam níveis reduzidos da proteína desacopladora 1 (UCP-1) (COMMINS et al., 1999; MASAKI et al., 2000), fazendo com que a obesidade desenvolva-se mesmo na ausência de hiperfagia (LOWELL et al., 1993). É provável, portanto, que dentre os mecanismos pelos quais os ratos NR mantenham o excesso de peso ao longo da vida é através de mudanças no metabolismo e gasto energético bem como nos sistemas e vias que os controlam (STEFANIDIS; SPENCER, 2012).

Usando o modelo de redução de ninhada, o grupo de Plagemann ainda demonstrou alterações centrais decorrentes da superalimentação precoce (PLAGEMANN, 2006b). Estudos eletrofisiológicos realizados em fatias de cérebro indicaram alterações na atividade neuronal de vários centros reguladores hipotalâmicos em resposta à insulina, leptina e vários neuropeptídeos, fornecendo uma base mecanicista para o sobrepeso persistente observado em ratos NR adultos. Esse grupo de pesquisadores demonstrou um aumento da inibição de neurônios do PVN pelo NPY, hormônio concentrador de melanina (*melanin-concentrating hormone* – MCH), AgRP e orexina B e diminuição da ativação destes neurônios CART e pelo hormônio estimulador de melanócitos (α -MSH) (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2005, PLAGEMANN, 2006b); resposta reduzida dos neurônios do PVN para os sinais de insulina, leptina e amilina (DAVIDOWA, ZISKA, PLAGEMANN, 2006), inibição reduzida dos neurônios do núcleo arqueado (ARC) pela amilina (DAVIDOWA, ZISKA, PLAGEMANN, 2004), falta de inibição, mas ativação desses neurônios pela insulina (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2007), inibição de neurônios do hipotálamo dorsomedial (DMH) e ventromedial pelo CART em ratos NR adultos (DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2005) e resistência hipotalâmica adquirida à leptina e insulina circulantes (PLAGEMANN et al., 1999a; PLAGEMANN et al., 1999b). Estes achados, tomados junto, indicam que uma forte predisposição para hiperfagia e ganho de peso é estabelecida em ratos superalimentados na lactação devido a ativação de vias orexigênicas e inibição de vias anorexigênicas.

Apesar de ainda não se conhecerem precisamente os mecanismos que induzem a obesidade, há um senso comum de que o padrão genético, hábitos alimentares e vida sedentária, em conjunto ou separadamente atuam diretamente

para o estabelecimento desse quadro (LACLAUSTRA; CORELLA; ORDOVAS; 2007; STOLAR, 2007). Com raízes na infância, a obesidade ao longo dos anos é acompanhada de substanciais comorbidades, a exemplo da hipertensão arterial, da intolerância à glicose, das alterações no metabolismo do colesterol, da síndrome metabólica, dos problemas ortopédicos, respiratórios e importantes disfunções psicossociais, que tendem a se agravar na vida adulta (ALVES et al., 2004). Quanto mais precoce é o aparecimento da obesidade, mais graves são as comorbidades desenvolvidas e associadas. Apesar disso, existe a possibilidade de um tratamento bem sucedido, quando iniciado em idade mais precoce (FREEDMAN et al., 1999; PREIS et al., 2010; SICHIERI; SIQUEIRA; MOURA, 2000), o que evidencia a importância da prevenção, do controle e da descoberta das possíveis alterações endócrinas que seriam responsáveis pela perpetuação da obesidade na infância até a fase adulta.

3 JUSTIFICATIVA

São muitos os fatores envolvidos na gênese precoce da obesidade. Alterações nutricionais, hormonais e ambientais na fase neonatal são capazes de promover alterações na homeostase contribuindo assim para o desenvolvimento de futuros distúrbios cardiometabólicos (GLUCKMAN; HANSON, 2007).

Em diferentes modelos experimentais de programação metabólica observam-se obesidade e hiperfagia, decorrentes de importantes alterações endócrino-metabólicas em períodos de alta susceptibilidade morfofuncional. No entanto poucos são os estudos que investigam o quadro de sobrepeso moderado a longo prazo. Sabe-se ainda, que um dos possíveis fatores coadjuvantes para o desenvolvimento de sobrepeso nesses modelos é o desbalanço entre ingestão e gasto energético, com participação importante do tecido adiposo marrom (BAT) no controle termogênico corporal. Torna-se, portanto, interessante investigar a possível contribuição de modificações no controle alimentar e no metabolismo energético mediada por hormônios que modulam esse controle em modelos representativos de condições fisiológicas habituais na população, como é o caso do sobrepeso moderado na fase adulta com raízes na infância.

Desta forma, buscamos o conhecimento sobre os prováveis distúrbios endócrinos que podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção das alterações metabólicas em um modelo experimental que mimetiza um importante subgrupo de obesos, o da obesidade neonatal, uma vez que se torna cada vez maior a incidência de obesidade infantil. Estes estudos poderão auxiliar na compreensão de mecanismos que possam atenuar os prejuízos ocasionados pelo excesso de peso e abrir novos caminhos profiláticos e/ou terapêuticos na prevenção e no combate da obesidade e de suas consequências.

4 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) e da colecistocinina-8 (CCK-8) no controle da ingestão alimentar e da temperatura corporal em ratos machos adultos jovens (60 dias) superalimentados na fase neonatal.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nos ratos adultos machos provindos de ninhada normal e reduzida:

- a) As alterações no peso, gordura corporal, níveis bioquímicos e hormonais, o metabolismo glicêmico e as alterações na ingestão alimentar para validação do modelo;
- b) Os efeitos do GLP-1 sobre a ingestão alimentar, níveis plasmáticos de glicose e insulina, temperatura corporal e ativação neuronal;
- c) Os efeitos da CCK sobre a ingestão alimentar, esvaziamento gástrico, temperatura corporal e ativação neuronal.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG (Protocolo nº. 568/2014, Anexo A) e estão descritos abaixo.

5.1 ANIMAIS

Ratas nulíparas adultas (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, a partir de 8 semanas de vida, pesando entre 180 a 220g foram obtidas do Biotério da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG e alojadas em sala climatizada a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas as 7:00h), em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção (39x31x17 cm³) com ração comercial (Nuvital®) e água *ad libitum*. Para o acasalamento, as fêmeas foram colocadas com machos sexualmente experientes, na proporção de 2 fêmeas para 1 macho. As fêmeas grávidas foram alojadas individualmente até o nascimento dos filhotes.

5.2 PADRONIZAÇÃO DE NINHADAS

No segundo dia pós-parto (PND2), algumas ninhadas foram ajustadas para três filhotes (uma fêmea e dois machos, grupo ninhada reduzida, NR) para induzir a superalimentação pós-natal precoce, reduzindo a competição pelo leite (CUNHA et al., 2009; FIOROTTO et al., 1991; HABBOUT et al., 2013). No grupo controle, o tamanho da ninhada foi mantido em 12 filhotes (relação macho / fêmea 1: 1, ninhada normal - NN) para nutrição pós-natal normal, conforme descrito anteriormente (CHEN et al., 2008; RAJIA; CHEN; MORRIS, 2010; VELKOSKA; COLE; MORRIS, 2005). Os animais foram desmamados no PND21, quando os filhotes machos de cada tamanho de ninhada foram alojados em grupos de quatro ratos por caixa, com acesso livre a alimentos em pellets e água até a realização dos testes aos 60 dias. As fêmeas foram eutanasiadas com anestésico inalantes (Halotano®). Apenas 2 filhotes de cada

ninhada foram utilizados para cada teste (CARVALHO et al., 2016, ENES-MARQUES; GIUSTI-PAIVA, 2018).

5.3 CIRURGIAS

As cirurgias pelas quais os animais nesse estudo foram submetidos são descritas abaixo.

5.3.1 *Canulação da veia jugular*

A fim de realizar a coleta de sangue durante os testes de tolerância à glicose e insulina foi realizada a canulação da veia jugular. Para executar o processo cirúrgico, os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich, Milwaukee, Wis., USA, 250 mg/kg i.p.) e submetidos ao implante cirúrgico de cânulas de polietileno. As cânulas utilizadas foram confeccionadas a partir de um tubo de silicone flexível (Silastic®) de 12 cm preso a uma base de Parafilm —Mll® Laboratory Film. Uma agulha 20 G foi conectada na cânula. Com o animal sob anestesia, uma incisão longitudinal foi feita sobre a área onde a veia jugular externa direita passa sob músculo peitoral maior. A agulha conectada a cânula foi inserida para o lúmen da veia. A cânula foi passada por dentro e fora do recipiente. Depois de retirada agulha, a cânula foi puxada para trás ligeiramente, com intuito de inseri-la no vaso. Após esse processo, a cânula foi pressionada para baixo, em direção ao coração. Com a cânula na veia, a folha de silicone foi suturada no músculo peitoral. A cânula foi exteriorizada na região escapular dorsal do rato com o auxílio de um trocater (HARMS; OJEDA, 1974).

5.3.2 *Probe de telemetria*

Para o monitoramento da temperatura corporal, os ratos foram primeiramente anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich, Milwaukee, Wis., USA, 250 mg/kg i.p.). Uma laparotomia mediana foi realizada para a inserção de uma cápsula de probe biotelemétrica (modelo PDT-4000 E-Mitter®, Bend, Oregon, USA) dentro da cavidade peritoneal. O músculo e a pele foram suturados separadamente com fio de algodão.

A cápsula implantada foi usada para aferições da temperatura corporal. O transmissor de biotelemetria implantado na cavidade peritoneal transmitia sinais, a cada um minuto, para uma placa receptora acoplada a um computador que repassou as informações para um *software* (Vital View, Mini Mitter), que armazenou os dados para análise posterior. Após a cirurgia os animais foram tratados com pentabiótico (24.000 UI/Kg, i.m) e colocados à temperatura de 32°C durante a recuperação da anestesia, como descrito previamente (GIUSTI-PAIVA et al., 2003; STEINER; COLOMBARI; BRANCO, 1999).

5.3.3 *Estereotaxia*

A cirurgia de estereotaxia foi realizada com a finalidade de permitir o acesso e canulação do ventrículo lateral (VL). Para isso, os animais anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina e tiveram a cabeça imobilizada por meio de fixação em três pontos, mandíbula e orifícios auditivos direito e esquerdo em estereotáxico digital. Uma incisão de aproximadamente 1.5 cm foi feita no tecido epitelial e subcutâneo, previamente tricotomizado, para possibilitar acesso à abóboda craniana. A superfície craniana foi limpa com água oxigenada 10% (v/v), conferindo maior nitidez ao ponto de encontro entre a suturas.

A matéria prima para confecção das cânulas, que mediam 10 mm, foi agulha hipodérmica estéril com 6 mm de diâmetro. O acesso ao VL foi permitido usando as coordenadas presentes no atlas “The Rat Brain”, de Paxino e Watson (1997): -0.8 mm posterior, -1.5 mm lateral e 3.6 mm ventral, tendo como ponto zero o bregma (ponto onde a sutura sagital encontra perpendicularmente a sutura coronal).

Para fixação da cânula e fechamento da incisão foi utilizado acrílico odontológico autopolimerizável capaz de formar uma espécie de capacete no local. Para evitar que o capacete de acrílico se descolasse do crânio do animal, dois parafusos de 5mm foram fixados nos ossos parietais direito e esquerdo, para servirem de suporte. Instantes antes do início da cirurgia administrou-se nos animais 0.02 mL de antibiótico veterinário (Pentabiótico) por via intramuscular.

Após a cirurgia os animais foram alocados individualmente em caixas de acrílico de formato retangular (30cm x 19.5cm x 12cm), onde permaneceram 7 dias para que pudessem se recuperar do procedimento cirúrgico (TEODORO et al., 2017). Ao final dos experimentos foi verificado o posicionamento correto da cânula através da infusão de 5µL do corante azul de Evans (2%). A visualização do corante no terceiro ventrículo sinalizava que o procedimento cirúrgico foi bem sucedido. Os animais que não tiveram o terceiro ventrículo corado não foram incluídos nas análises estatísticas.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE

Para caracterização do efeito da superalimentação neonatal foi avaliado o ganho de peso da ninhada durante o período lactacional a cada 3 dias (2º, 5º, 8º, 11º, 14º, 17º e 20º PND). Após o desmame o peso de cada animal foi avaliado individualmente, uma vez por semana, até a 8ª semana de vida. A caracterização da obesidade nos animais adultos (60 dias) se deu com base na avaliação do peso corporal, Índice de Lee, quantificação da adiposidade abdominal, histologia do tecido adiposo, perfil bioquímico e hormonal.

5.4.1 Índice de Lee

Depois de anestesiados com anestésico inalante, o comprimento nasoanal e o peso de cada animal foi mensurado e a correlação do peso/comprimento se deu por meio do índice de Lee, que é a relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento nasoanal do animal [$\sqrt[3]{\text{Peso (g)}/\text{CNA(cm)}} \times 1000$]. Diferentemente do IMC ele não tem um nível classificatório, sendo assim quem tem maior valor resultante do índice de Lee revela uma maior propensão de apresentar maiores índices de adiposidade (DE MOURA et al., 2009).

5.4.2 Quantificação da adiposidade abdominal e histologia de tecido adiposo

A quantificação da adiposidade abdominal foi realizada após o sacrifício do animal, por meio de dissecação dos depósitos abdominais de gordura epididimal e retroperitoneal, os quais foram imediatamente pesados. O resultado foi expresso em g/100g de peso corporal (FERNANDEZ et al., 2009).

Para a histologia, uma porção do tecido adiposo branco epididimal (WAT, ± 0.3 g) e o tecido adiposo marrom (BAT) foram fixados em formaldeído a 40% em tampão fosfato-salina tamponada (PBS), pH 7.2, durante 48h à 4°C. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e xilol, e incorporado em parafina à 60°C. As secções de 7 μ m foram cortadas em micrótomo (Leica, Wetzlar, Alemanha) e coradas por hematoxilina e eosina (H/E). As imagens digitais foram obtidas a partir dos cortes histológicos com o microscópio Olympus BX40 (Olympus, Tóquio, Japão) usando um objetivo de 20x para WAT e 40x para o BAT. A partir de cada rato, obteve-se 3 lâminas cegas, das quais foram retiradas 5 imagens de diferentes campos. A partir de cada imagem, o número total e a área de 10 adipócitos foram medidas com auxílio do *software* Image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) (adaptado de Conceição et al., 2011).

5.4.3 Dosagens bioquímicas e hormonais

Amostras de sangue foram obtidas após decaptação dos animais sob jejum de 12h. O sangue coletado do tronco (5 mL) em tubos plásticos contendo heparina foi mantido sob gelo e o plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4°C, 15 min.). As alíquotas mantidas a -80°C até o momento das dosagens de glicose, triglicérides, colesterol total e colesterol HDL através de método enzimático-colorimétrico (In Vitro Diagnóstica®, Brasil). LDL-c e VLDL-c foram obtidos por cálculos de Friedewald (1972):

$$1) \text{ LDL-c (mg/dL) = colesterol total - (HDL-c + VLDL-c)}$$

$$2) \text{ VLDL-c (mg/dL) = Triglicerídeos/5}$$

Leptina e insulina plasmáticas foram quantificadas método de Elisa (*Enzo Life Sciences*®), conforme instruções do fabricante.

5.5 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E À INSULINA

Os animais adultos foram submetidos a avaliação da secreção e da ação periférica da insulina, através do teste de tolerância oral à glicose (GTT_o) e teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ITT_i), respectivamente. Ambos testes foram realizados após um jejum: 8 horas para ITT_i ou 12h (GTT_o) e canulação prévia da veia jugular para coleta do sangue.

No GTT_o, uma solução de glicose 30% (2.5 g/Kg de p.c.) foi administrada por via oral (gavagem) e uma amostra de sangue foi coletada antes e após 30, 60, 90 e 120 minutos da carga glicêmica. A avaliação das respostas glicêmicas durante o teste foi efetuada através do cálculo da área sob a curva (AUC=mg.min) (adaptado de Zhang et al., 2016).

No ITT_i, a insulina regular da marca Insunorm R® foi injetada via intraperitoneal (1.5UI/Kg). A glicemia foi mensurada antes da aplicação da insulina e nos tempos 4, 8, 12, 16 minutos após a administração da mesma. A taxa de decaimento da glicose (K_{ITT}) foi calculada e expressa em %/minuto (MOURA, 2010).

Todas as amostras obtidas foram centrifugadas a -4°C, 3.000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e em seguida foram realizadas as dosagens de glicose. As concentrações de glicose sanguínea foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase. As absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro a 500nm.

A quantificação da resistência à insulina se deu pelo modelo homeostático de avaliação (HOMA), calculado utilizando a seguinte fórmula: Glicemia em jejum (mMol) x Insulina (μU/mL)/22.5 (MATTHEWS et al., 1985). O índice triacilglicerídeos/glicose (Tyg), um método recentemente validado para determinar a resistência à insulina (GUERRERO-ROMERO et al., 2010), foi calculado com base na seguinte fórmula: Ln [triacilgliceridemia de jejum (mg dL⁻¹) x glicemia de jejum (mg dL⁻¹)^{1/2}].

5.6 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR

Para avaliar a ingestão diária de ração, os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas e alojados individualmente. Os primeiros 4 dias nas gaiolas foi considerado como o período de ambientação dos animais. No dia anterior ao experimento, os animais foram privados de alimento por 12h, mas não foram privados de líquido. Após esse período, a comida (em quantidade pré-conhecida) foi ofertada aos animais *ad libitum* e a ingestão foi medida pela subtração do peso restantes após 24h da oferta inicial de alimento colocado no recipiente, com correção para o derramamento (ORLANDI et al., 2015; RORATO et al., 2012). Essa quantificação foi realizada semanalmente da 4ª a 8ª semana de vida dos animais.

5.7 RESPOSTA TÉRMOGÊNICA À NORADRENALINA (NE)

Os animais foram mantidos em caixas individuais durante seis ou sete dias. No dia anterior ao teste as caixas foram posicionadas sobre o receptor de telemetria (modelo ER-4000 Energizer/Receiver Mini-Mitter®, Bend, Oregon, USA) conectado a um computador.

O teste iniciou pela aferição da temperatura basal (calculada pela média das temperaturas aferidas 40 minutos antes da administração da droga ou salina). Finalizada o monitoramento da temperatura corporal após o desafio o desafio com noradrenalina, calculou-se a diferença da temperatura pela média da temperatura basal e obteve-se o delta da temperatura. Os dados da telemetria foram apresentados pelo gráfico linear da variação do delta e as estatísticas foram realizadas pela área sob a curva (AUC) calculada a partir de um intervalo definido, obtendo-se o índice térmico para este período (IT, Celsius x minutos) (SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2014).

No dia do teste a temperatura basal foi calculada antes da administração de Noradrenalina ((±)-Arterenol ([±])-Hydrocloride, Sigma Aldrich, St Louis, MO, 0.01mg/Kg, i.p). A temperatura corporal foi registrada em intervalos de 5 minutos durante 80 minutos após esta injeção.

5.8 AVALIAÇÃO DO ESVAZIAMENTO GÁSTRICO

A quantificação do esvaziamento gástrico foi realizada usando o método de fenol *red* (corante não absorvível). Este procedimento é uma modificação de um método de recuperação de corantes originalmente descrito por Scarpignato et al. (1996). Após jejum *overnight*, 1.5mL de um gel alcalórico contendo 1.0% de carboximetilcelulose (Êxodo Científica Ltda, Hortolândia, Brasil) e 0.05% de indicador de fenol *red* foi administrado intragastricamente aos ratos conscientes. Vinte minutos após a gavagem, os ratos foram anestesiados usando tribromoetanol (250 mL/Kg). A cavidade abdominal foi aberta, a junção gastroesofágica e o piloro foram clampados, o estômago foi removido, aberto ao longo da curvatura maior e conteúdo gástrico coletado em tubo graduado. O estômago foi cuidadosamente enxaguado três vezes com 2 ml de água destilada e as soluções de lavagem foram adicionadas ao conteúdo gástrico recuperado. Foi acrescentado 0.5 mL de NaOH 1M. A concentração de vermelho de fenol na mistura foi então medida por espectrofotometria a 560nm para a realização do cálculo da quantidade total do marcador recuperado do estômago.

5.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA c-FOS

Para realização dos experimentos de imuno-histoquímica, os animais foram mantidos em uma sala com ciclo claro/escuro invertido artificialmente (claro: 19h as 7h, escuro: 7h as 19h), com alimentação e água *ad libitum* e temperatura controlada $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os mesmos foram transferidos para essa sala 40 dias antes do início do teste para adaptação ao ciclo invertido. Esse procedimento foi realizado, para permitir a realização dos experimentos de coleta de tecido na fase escura do ciclo dos animais, período mais ativo e de maior ingestão do rato (PRAGER et al., 2011; POSSAMAI et al., 2015).

Após a realização do protocolo, os animais foram submetidos a anestesia com 2,2,2-tribromoetanol (250mL/Kg) e perfusão através de punção intracardíaca com salina 0.9% contendo 5000 U/L de heparina (250 ml), seguido do fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PBS 0.1M, 500 ml). Finalizada a perfusão, o

encéfalo foi removido, imerso em solução fixadora (paraformaldeído 4%) por 4h, posteriormente transferido para uma solução de sacarose 30% em PBS e mantido a 4°C até a realização dos cortes. Os encéfalos foram seccionados em 30µm de espessura com auxílio do criostato (Slee Technik GmbH, Mainz – Germany), em plano coronal para realização do processamento imuno-histoquímico.

A fim de evidenciar as células imunorreativas para a proteína c-Fos (indicadora de ativação neuronal) os cortes foram expostos inicialmente à peroxidase endógena (solução de H₂O₂ 1%) por 30 minutos. Posteriormente foi realizada uma sequência de 3 lavagens dos cortes (5 minutos cada) com tampão fosfato PBS 0.01M sob agitação. Em seguida, foi efetuado o bloqueio das ligações inespecíficas com albumina bovina 5% em tampão fosfato 0.1M, durante 01 hora. Na sequência, foi realizada a incubação com anticorpos primários policlonais, anti-proteína c-Fos (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), diluído a 1:10000 em PBS 0.1M, contendo 2% de soro normal de cabra e 0.3% de Triton X-100 (Sigma Aldrich, St Louis, MO), por 16 a 18 horas. Terminado o período de incubação foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos cada uma, em PBS 0.01M e realizada a incubação com anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) na diluição 1:200 por 1 hora. Em seguida os cortes foram novamente lavados por 3 vezes sob agitação em PBS 0.01M. Posterior às lavagens foi realizada a incubação dos cortes com o complexo avidina-biotina peroxidase, durante 1 hora sob agitação. A marcação preta-azulada do núcleo celular foi detectada utilizando 3,3 diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB, Sigma Aldrich, St Louis, MO), intensificado com sulfato de níquel a 1% e cloreto de cobalto a 1%. Após realização do procedimento foi realizada a lavagem dos cortes com PBS 0.01M para interrupção da coloração. Ao fim deste processo os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secos *overnight* a temperatura ambiente, desidratados com xileno e cobertos com lamínulas fixadas por Entellan (Merck, Alemanha). A análise da marcação das células foi realizada com auxílio de um microscópio Nikon H55L, que permitiu a contagem do número de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos por meio do software *NIS-Elements Advanced Research 3.0* (ORLANDI et al., 2015). As secções escolhidas para a quantificação foram identificadas e selecionadas de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1997).

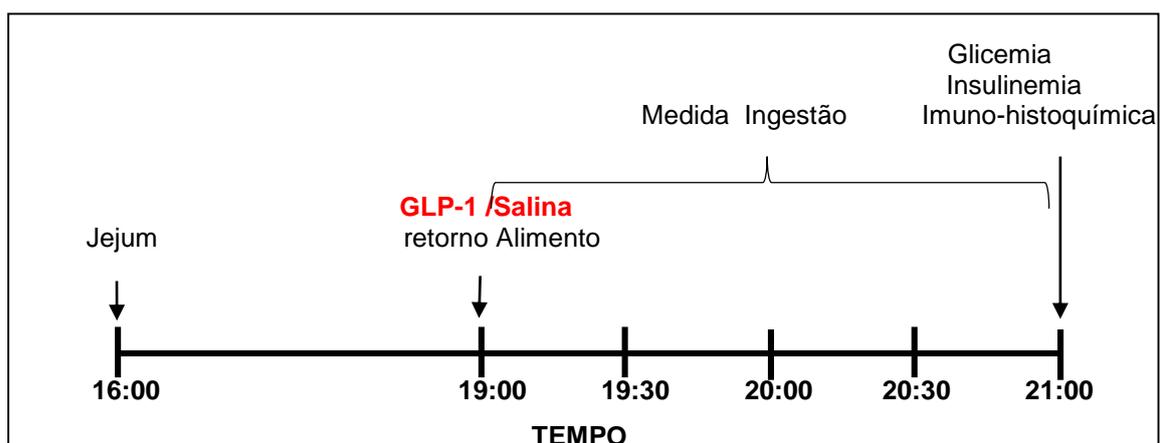
Os neurônios imunorreativos para c-Fos foram contados na área postrema (AP, 14.04mm posterior ao bregma), núcleo do trato solitário (NTS, 14.04mm posterior ao bregma), núcleo paraventricular (PVN, 1.32mm posterior ao bregma), amígdala central (CeA, 1.80mm posterior ao bregma), hipotálamo dorsomedial (DMH, 3.00mm posterior ao bregma), hipotálamo ventromedial (VMH, 3.00mm posterior ao bregma) e núcleo arqueado (ARC, 3.00mm posterior ao bregma), áreas com populações neuronais que secretam peptídeos orexigênicos e anorexigênicos que modulam a ingestão alimentar.

5.10 DESIGN EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 (GLP-1) E DA COLECISTOCININA-8 (CCK-8) EM RATOS NN E NR

O GLP-1 (7-36) amida (Sigma Aldrich, St Louis, MO) foi utilizado para avaliação dos efeitos anorexígenos nesses animais. GLP-1 foi reconstituído em 1 mL de ácido acético 1%, conforme recomendação do fabricante. Os experimentos foram realizados no início da fase escura (19h), quando os animais têm maior estímulo para comer.

Os experimentos com o GLP-1 foram realizados seguindo o delineamento experimental abaixo.

Figura 4 – Design experimental dos experimentos realizados com *glucagon-like peptide-1* (GLP-1).

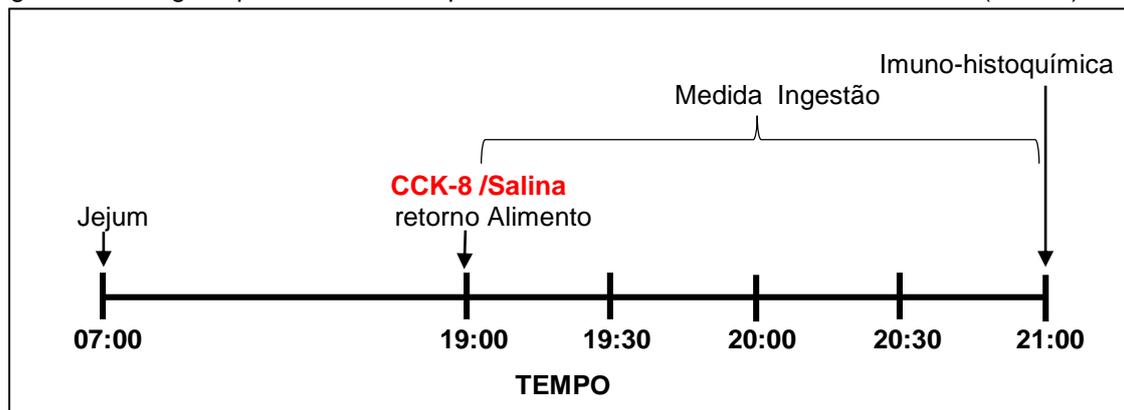


Fonte: Da autora.

O hormônio (TYR[SO₃H]²⁷) colecistocinina-8 (CCK-8S) 26-33 amida (Sigma Aldrich, St Louis, MO) foi utilizado para avaliação dos efeitos anorexígenos nesses animais. Para tal, o hormônio foi reconstituído em 1 mL de NH₄OH 0.05M, conforme recomendação do fabricante.

Os experimentos com a CCK-8 foram realizados seguindo o delineamento experimental abaixo.

Figura 5 - Design experimental dos experimentos realizados com colecistocinina-8 (CCK-8).



Fonte: Da autora.

5.10.1 Efeito do GLP-1 sobre a ingestão alimentar, glicemia e insulinemia

Cinco dias antes do teste, os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas com ração e água *ad libitum*. Diariamente, esses animais receberam injeções intraperitoneais de solução salina (1mL/kg) às 19h para adaptá-los ao procedimento experimental e não reduzir a ingestão alimentar pelo estresse de injeção. Os grupos experimentais foram NN salina, NN GLP-1, NR salina e NR GLP-1 (n=8).

No dia do teste, os animais passaram por um período de 3 horas de privação de alimento, mas não de água (iniciando às 16h). No início da fase escura, um grupo recebeu uma injeção intraperitoneal (i.p) de GLP-1 (10 µg/kg) e o segundo grupo recebeu solução salina (1 mL/kg, i.p). Imediatamente após a injeção, os ratos receberam acesso ao alimento e a ingestão acumulada, corrigida para o derramamento, foi medida manualmente após 30, 60, 90, 120 minutos (protocolo

adaptado de WILLIANS et al., 2011). Após esse período, os animais foram decapitados, o sangue foi coletado, centrifugado e o plasma armazenado a -80°C para posterior quantificação de insulina (pelo método de Elisa) e glicose (pelo método enzimático-colorimétrico).

5.10.2 Efeito do GLP-1 sobre a ativação de áreas encefálicas

Após a realização do protocolo anteriormente descrito (item 5.11.1) para desafio hormonal (privação de alimento, administração de GLP-1 ou salina, acesso ao alimento por 2h), os animais foram submetidos a anestesia e perfusão através de punção intracardíaca. Ao final desse procedimento o encéfalo foi removido para realização dos processos de imuno-histoquímica a fim quantificar o número de células positivas para proteína c-FOS em áreas relacionadas ao controle da ingestão alimentar.

5.10.3 Efeito do GLP-1 sobre a temperatura corporal

Após a cirurgia de estereotaxia e implante de probe (descritas no item 5.4.2 e 5.4.3), os animais foram transferidos para a sala de telemetria anteriormente ao dia do teste e suas caixas foram posicionadas sobre o receptor biotelemétrico conectado a um computador para monitoramento da temperatura corporal. No dia do teste, após 40 minutos da medida basal, os animais NN e NR receberam microinjeção i.c.v de GLP-1 (5µg em 10µL) ou salina (10 µL) e tiveram sua temperatura corporal monitorada por 4h.

5.10.4 Efeito da CCK-8 sobre a ingestão alimentar

Após adaptação prévia de 5 dias em gaiolas metabólicas e recebendo administração i.p diária de salina, os animais passaram por um período de 12 horas de privação de alimento, mas não de água (iniciando às 7h). Os grupos experimentais foram definidos em NN salina (NN sal), NN CCK, NR salina (NR sal) e NR CCK. No

início da fase escura (19h), um grupo recebeu uma injeção intraperitoneal (i.p) de CCK-8 (0.5 ug/Kg) e o segundo grupo recebeu solução salina (1 ml/kg, i.p). Imediatamente após a injeção, os ratos receberam acesso ao alimento e a ingestão acumulada, corrigida para o derramamento, foi medida manualmente após 30, 60, 90 e 120 minutos (protocolo adaptado de BECSKEI et al., 2007).

5.10.5 Efeito da CCK-8 sobre o esvaziamento gástrico

Para realização da quantificação do esvaziamento gástrico, os animais foram submetidos a jejum durante a noite assegurando o esvaziamento do conteúdo gástrico. Após o período de privação, os ratos foram pesados e divididos em grupos de solução salina ou CCK-8 (NN Sal, NN CCK, NR Sal, NR CCK). Todas as soluções foram aquecidas até a temperatura corporal antes da administração. Cinco minutos antes do teste, CCK-8 (0.05 µg/Kg) ou solução salina (1 mL/Kg) foram administradas intraperitonealmente nos animais (McCann et al., 1989). Em seguida, o gel acalórico com o corante fenol *red* foi administrado intragastricamente aos ratos conscientes. Vinte minutos após a gavagem, o estômago removido e o conteúdo gástrico recuperado para determinação da porcentagem de esvaziamento gástrico.

5.10.6 Efeito da CCK-8 sobre a ativação de áreas encefálicas

O procedimento de imuno-histoquímica frente ao desafio com a CCK-8 foi conduzido de forma semelhante ao citado no item 5.11.2. Os animais foram previamente adaptados em uma sala de ciclo invertido e, antes da realização da perfusão, os animais foram submetidos ao protocolo de desafio hormonal com CCK descrito no item 5.11.4. As áreas cerebrais avaliadas foram as mesmas utilizadas no grupo GLP-1.

5.10.7 Efeito da CCK-8 sobre a temperatura corporal

Além da cirurgia de implante de probe e estereotaxia, conforme descrito anteriormente e recuperação pós-cirúrgica, os animais foram transferidos para a sala de telemetria e posicionadas sobre o receptor conectado a um computador.

No dia do teste, após 40 minutos da medida basal, os animais receberam microinjeção i.c.v de colecistocinina-8 (0.5µg em 5µL) ou salina (5 µL) e tiveram sua temperatura corporal monitorada por 4h.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando um *software* GraphPad versão 6.0 e expressos como média±erro padrão da média (EPM). Para comparação entre a diferença do tamanho da ninhada (NN x NR) para os parâmetros de peso, perfil bioquímicos e biométrico, ação de noradrenalina foi aplicado o teste “t” de *Student*. O tamanho da ninhada (normal ou reduzida) e o tratamento (salina ou hormônio) ou o tempo foram utilizados como fatores para análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni para o estudo da ingestão alimentar, da tolerância à glicose/Insulina e dos efeitos do *glucagon-like peptide-1* e da colecistocinina-8. Os resultados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo são descritos abaixo.

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE

A caracterização da obesidade nos animais se deu pelo peso corporal, adiposidade, Índice de Lee, perfil bioquímico e hormonal.

6.1.1 Ganho de peso

O ganho de peso corporal entre os grupos experimentais exibiu diferença desde o período lactacional até a fase adulta. Durante a lactação (2º ao 21º dia de vida) o peso dos animais NR foi significativamente maior do 8º ao 20º PND quando comparados à filhotes NN, sendo que esse aumento foi de 31.7% no oitavo dia pós-natal, alcançando 46.5% no vigésimo ($p < 0.001$, Tab.1).

Tabela 1 - Efeito da superalimentação neonatal sobre o peso da **ninhada** durante o período lactacional.

Animal	PESO (g)						
	2º DL	5º DL	8º DL	11º DL	14º DL	17º DL	20º DL
NN	7.39±0.17	10.68±0.40	14.89±0.45	19.57±0.38	24.72±0.62	28.89±0.39	34.34±0.72
NR	7.73±0.19	12.78±0.51	19.62±0.58**	28.04±0.87***	35.88±1.07***	43.07±1.57***	50.32±1.91***

Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=8. **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, quando comparados à prole provinda de NN. Valores expressos como média ± EPM (Teste *t* de Student).

Após o desmame os animais passaram a ser pesados individualmente e os animais NR continuaram apresentando um peso maior quando comparados aos animais NN. Os animais de ninhada pequena apresentaram um aumento de 48.8% na 4ª semana, 58.4% na 5ª semana, 43.3% na 6ª semana, 25.2% na 7ª semana e 23.0% na 8ª semana ($p < 0.001$, Tab. 2) quando comparados aos filhotes crescidos em ninhada grande.

Tabela 2 - Efeito da superalimentação neonatal sobre o peso dos **animais** pós-desmame.

	PESO (g)				
	4ª semana	5ª semana	6ª semana	7ª semana	8ª semana
NN	76.2±1.17	123.0±1.89	168.0±3.55	216.8±1.24	261.3±2.81
NR	113.4±2.85***	194.9±3.57***	240.9±4.58***	271.5±2.69***	321.6±6.30***

Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=8. ***, p<0.001, quando comparados à prole provinda de NN. Valores expressos como média ± EPM (Teste t de Student).

6.1.2 Índice de Lee e adiposidade

Os animais NR apresentaram valores maiores do Índice de Lee (p<0.001, Tab. 3) aos 60 dias de idade, quando comparados aos animais NN.

Em relação ao acúmulo de gordura abdominal, os animais do grupo NR apresentaram aumento da adiposidade, decorrente do aumento na massa de tecido adiposo epididimal (p<0.001) e retroperitoneal (p<0.001), mas não no tecido adiposo marrom (p=0.25), quando comparados com animais de ninhada grande. Não houve diferença na distância nasoanal entre os grupos.

Tabela 3 - Efeito da superalimentação neonatal sobre o Índice de Lee e adiposidade das proles.

Parâmetros	Animal	
	NN	NR
Distância nasoanal (cm)	20.72±0.14	20.94±0.19
Índice de Lee	3.06±0.01	3.27±0.01***
Gordura epididimal (g/100g)	0.72±0.01	0.97±0.03***
Gordura retroperitoneal (g/100g)	0.61±0.02	1.07±0.05***
Gordura marrom (g/100g)	0.11±0.01	0.12±0.01

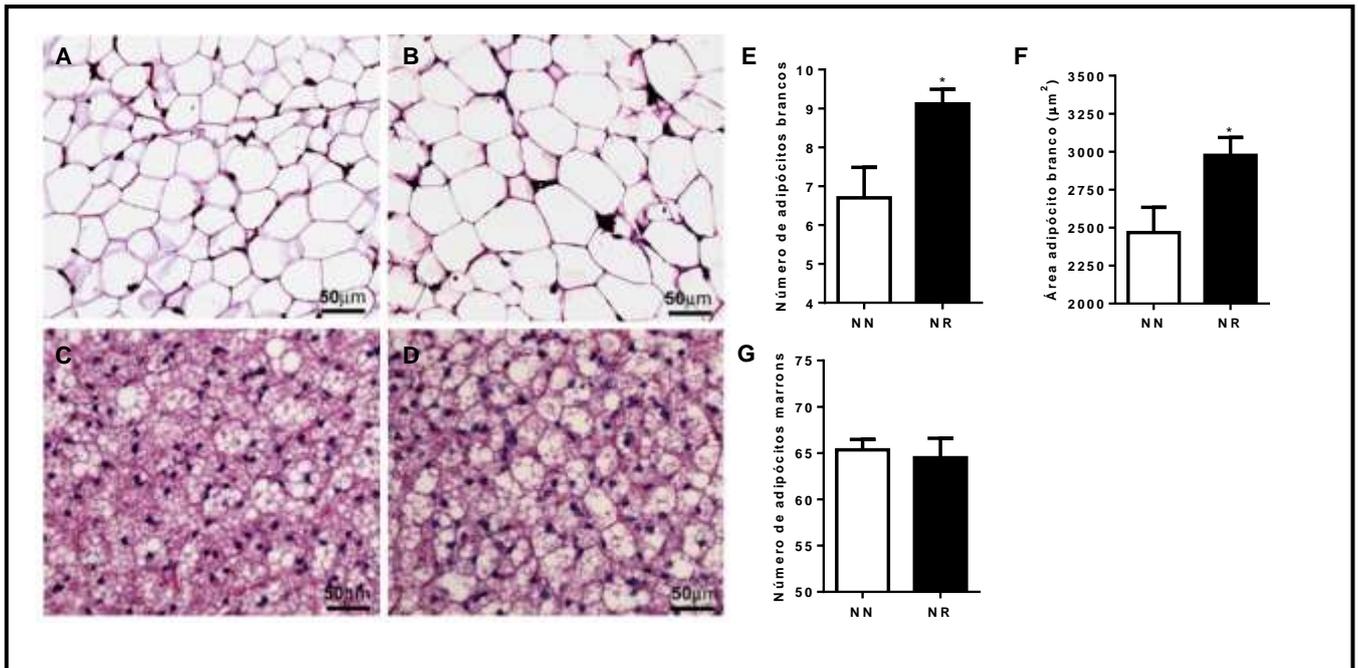
Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=8. *, p<0.05, ***, p<0.001, quando comparados à prole provinda de NN. Valores expressos como média ± EPM (Teste t de Student).

A Figura 6 mostra as alterações histológicas em ratos NN e NR (Fig. 6 A – D). A análise morfológica mostrou que os animais criados em ninhada pequena apresentaram um aumento no número (de 6.7±0.78 para 9.12±0.37, p<0.05, Fig. 6E) e na área dos adipócitos brancos (de 2468±165.8 para 2976±117.3µm², p<0.05, Fig. 6F). Não houve diferença significativa quanto ao número de adipócitos marrons

quando compara-se animais NN e NR (65.36 ± 1.1 vs 64.5 ± 2.1 , $p=0.71$, Fig. 6G). Adipócitos marrons são tipicamente multiloculares, sendo a maior parte da célula ocupadas por numerosas gotas lipídicas circulares, que apareceram como áreas vazias ou não manchadas em NN e NR animais.

Figura 6 - Efeito da superalimentação neonatal sobre a histologia dos tecidos adiposos branco epididimal (WAT) e marrom (BAT) de ratos adultos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. $n=5$. A) WAT de animais NN; B) WAT de animais NR; C) BAT de animais NN; D) BAT de animais NR; E) Número de adipócitos brancos; F) Área do adipócito branco; G) Número de adipócitos marrons. *, $p<0.05$, quando comparado à ninhada normal. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t* de Student).

6.1.3 Dosagens bioquímicas e hormonais

Os filhotes machos de ninhada reduzida apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de glicose em jejum ($p<0.05$), triglicerídeos ($p<0.01$), colesterol total ($p<0.01$), VLDL-c ($p<0.01$), LDL-c ($p<0.05$), insulina ($p<0.05$) e leptina ($p<0.01$, Tab. 4) quando comparados com animais criados em ninhada normal. Já os níveis plasmáticos de HDL-c apresentaram-se diminuídos nos animais NR ($p<0.001$), em relação ao seu controle.

Tabela 4 - Efeito da superalimentação neonatal sobre o perfil bioquímico e hormonal de ratos adultos.

Parâmetro	ANIMAL	
	NN	NR
Glicose (mg/dL)	104.90±4.80	122.20±4.58*
Triglicerídeos (mg/dL)	187.70±9.86	265.90±16.67**
Colesterol Total (mg/dL)	97.85±3.25	115.10±3.12**
VLDL-c (mg/dL)	37.55±1.97	53.17±3.33**
LDL-c (mg/dL)	53.47±2.88	68.68±5.48*
HDL-c (mg/dL)	6.93±0.33	4.71±0.46***
Insulina (ng/mL)	1.47±0.17	2.30±0.28*
Leptina (ng/dL)	0.69±0.10	1.92±0.25**

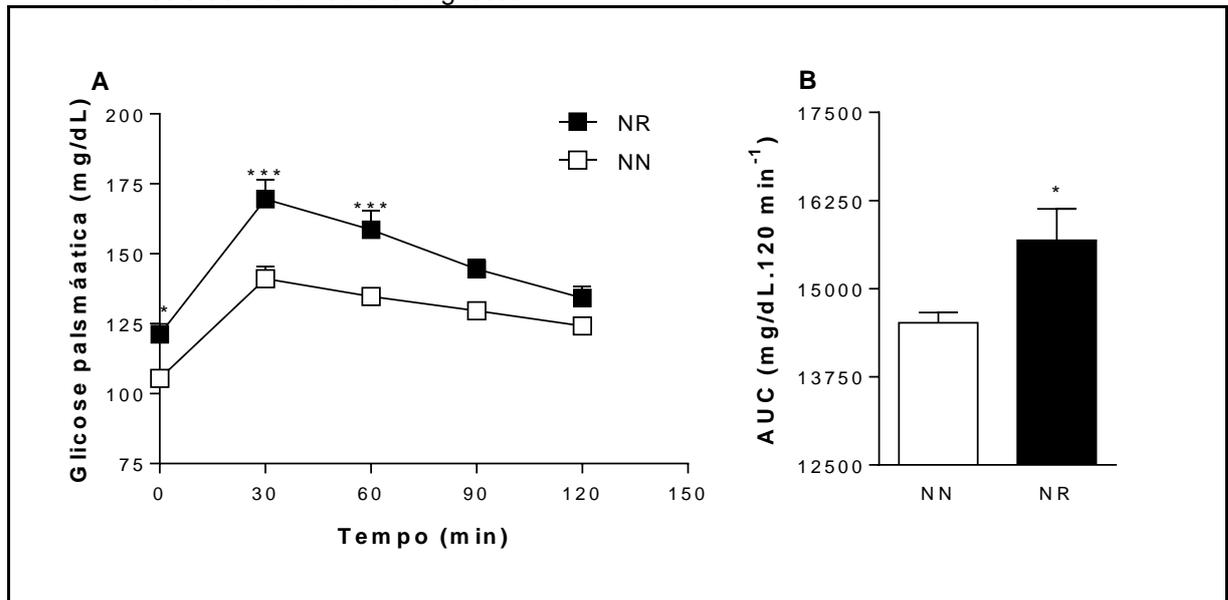
Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=8. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001, quando comparados à animais NN. Valores expressos como média ± EPM (Teste t de Student).

6.2 TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE (GTT_o)

O perfil glicêmico durante o GTT_o em animais machos provenientes de ninhada normal e reduzida é apresentado na figura 7 e pelos resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* da tabela 5. Os animais machos NR apresentaram diferença significativa nos tempos de 0, 30 e 60 minutos após a carga glicêmica, sendo que os níveis de glicose foram maiores nesses animais quando comparados aos seus controles (105.5±0.91 vs 121.2±3.74, p<0.05 no tempo 0; 141.1±4.41 vs 169.5±9.90, p<0.001 aos 30 min.; 134.7±1.36 vs 158.6±6.70mg/dL, p<0.001, aos 60 min., Fig. 7A). Na análise da área sob a curva os machos de ninhada pequena também apresentaram aumento, quando comparados a machos de ninhada grande (de 14515±146.4 para 15668±446.0mg/dL.120min⁻¹, p<0.05, Fig 7B), indicativo de intolerância à glicose.

Figura 7 - Efeito da superalimentação neonatal sobre o perfil glicêmico de animais machos frente o teste de tolerância oral à glicose.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=8. A) Níveis plasmáticos de glicose; B) Área sob a curva. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ quando comparado à ninhada normal. Valores expressos como média \pm EPM (análise de variância ANOVA *two-way*, seguido de pós-teste de *Bonferroni*).

Tabela 5 - Análise de variância de duas vias da glicemia plasmática de ratos submetidos ao teste de tolerância oral à glicose.

Glicose plasmática	Tratamento	Tempo	Interação
	$F_{1,70} = 50.98, p < 0.001$	$F_{4,70} = 30.91, p < 0.001$	$F_{4,70} = 1.62, p = 0.17$

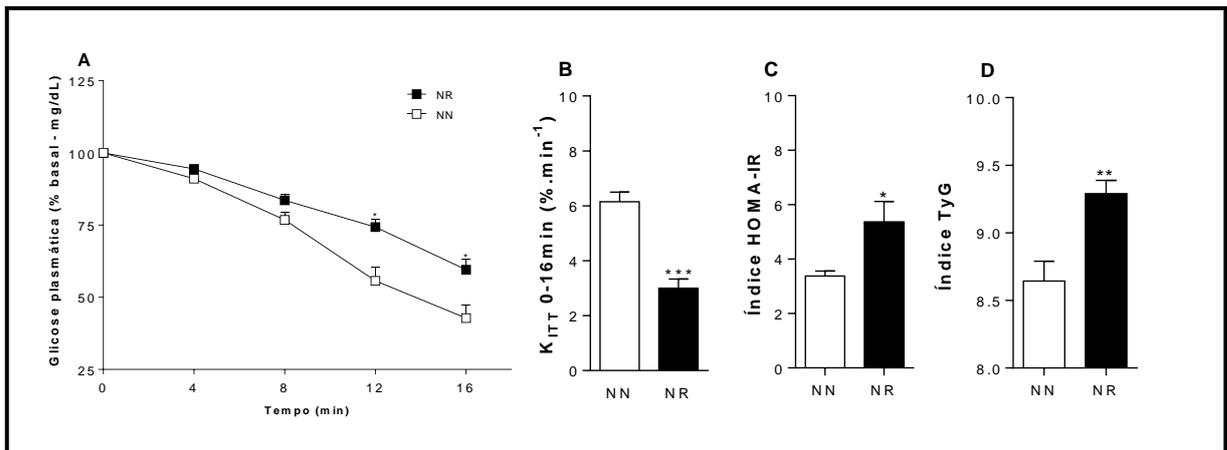
Fonte: Da autora.

6.3 TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À INSULINA (ITTi)

O resultado do ITTi são apresentados na figura 8 e pelos resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* da tabela 6. Os animais machos criados em ninhada pequena apresentaram níveis de glicemia significativamente superiores nos tempos 12 ($71.13 \pm 3.92 \text{ mg/dL}$, $p < 0.05$) e 16 minutos ($56.70 \pm 4.17 \text{ mg/dL}$, $p < 0.05$) em comparação com os animais de ninhada maior ($55.71 \pm 4.74 \text{ mg/dL}$ e $42.80 \pm 4.42 \text{ mg/dL}$, respectivamente, Fig. 8A), frente ao teste de ITTi. Já a taxa de decaimento de glicose (K_{ITi}) foi inferior em machos NR (3.00 ± 0.32 , $p < 0.001$), quando comparados aos seus correspondentes de ninhada normal (6.15 ± 0.34 , Fig. 8B). Esse resultado indica menor sensibilidade à insulina em animais NR.

O índice HOMA demonstrou-se maior em animais que foram criados em NR quando comparados à filhotes provindos de NN (3.37 ± 0.18 vs 5.36 ± 0.75 , $p < 0.05$, Fig. 8C). O índice TyG também foi maior em animais de ninhada menor (de 8.64 ± 0.146 vs 9.29 ± 0.097 , $p < 0.01$, Fig. 8D). Esses resultados são indicadores de resistência à insulina nos animais criados em ninhada reduzida.

Figura 8 - Efeito da superalimentação neonatal sobre o perfil glicêmico de animais machos adultos frente o teste de tolerância intraperitoneal à insulina.



Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=8. A) Níveis plasmáticos de glicose B) Taxa de decaimento de glicose (K_{ITT}); C) Índice HOMA-IR; D) Índice TyG. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ quando comparado à ninhada normal. Valores expressos como média \pm EPM (análise de variância ANOVA *two-way*, seguido de pós-teste de *Bonferroni*).

Fonte: Da autora.

Tabela 6 - Análise de variância de duas vias da glicemia plasmática de ratos submetidos ao teste de tolerância intraperitoneal à insulina.

Glicose plasmática	Tratamento	Tempo	Interação
	$F_{1,52} = 5.31$, $p = 0.038$	$F_{4,52} = 142.0$, $p < 0.001$	$F_{4,52} = 4.17$, $p = 0.005$

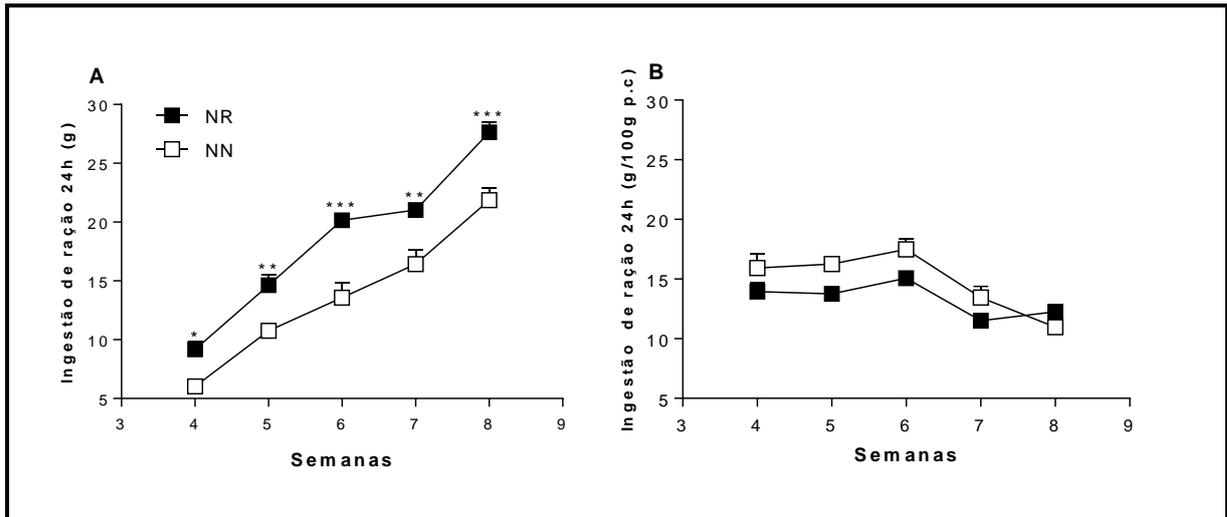
Fonte: Da autora

6.4 INGESTÃO ALIMENTAR

Conforme demonstrado na figura 9 e tabela 7, os machos NR apresentaram aumento na ingestão de ração em relação aos animais de ninhada normal da 4^a até a 8^a semana de vida (4^a semana: NN 6.03 ± 0.52 , NR 9.16 ± 0.66 g, $p < 0.05$; 5^a semana: NN 10.76 ± 0.52 , NR 14.62 ± 0.90 g, $p < 0.01$; 6^a semana: NN 13.56 ± 1.29 , NR

20.14±0.61g, $p<0.001$; 7ª semana: NN 16.42±1.18, NR 21.03±0.61g, $p<0.01$; 8ª semana: NN 21.86±1.00, NR 27.64±0.87g, $p<0.01$; Figura 9A), indicando hiperfagia. Contudo, quando a ingestão foi normalizada para o peso corporal, a diferença não foi significativa (Fig. 9B).

Figura 9 - Efeito da superalimentação neonatal sobre a ingestão alimentar de filhotes machos do pós-desmame à fase adulta.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=8. (A) Ingestão de ração (g); (B) Ingestão de ração ajustada por 100g de peso. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$. Valores expressos como média ± EPM (análise de variância ANOVA *two-way*, seguido de pós-teste de *Bonferroni*).

Tabela 7 - Análise de variância de duas vias da ingestão de ração por ratos adultos pós-desmame.

Ingestão alimentar	Tratamento	Tempo	Interação
	$F_{1,70}= 55.81, p=0.23$	$F_{4,70}=83.43, p<0.001$	$F_{4,70}=1.41, p<0.001$

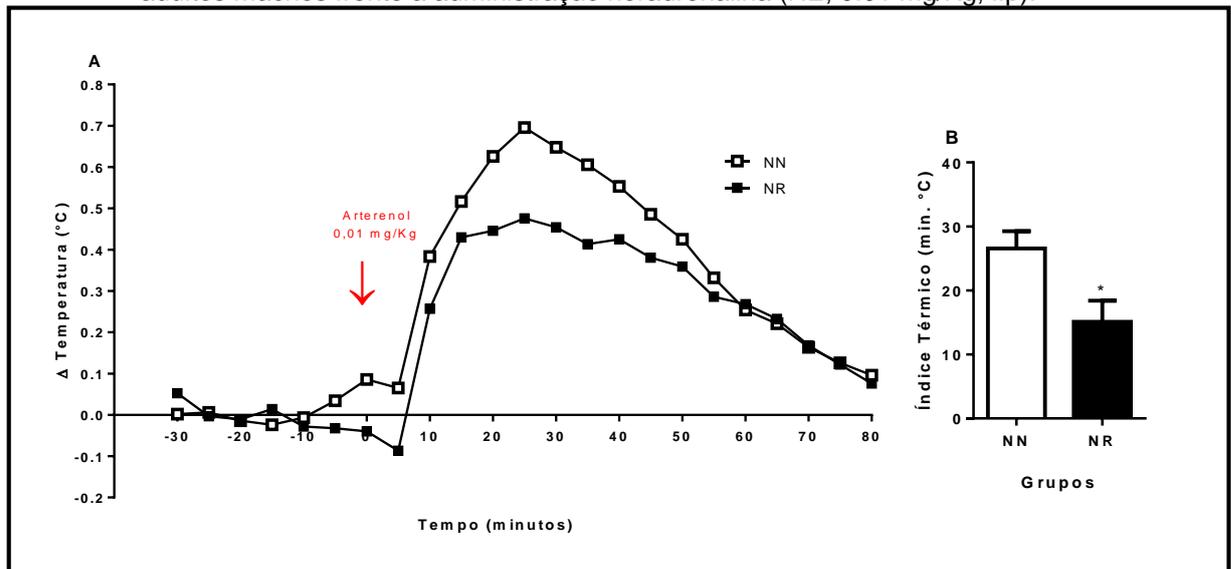
Fonte: Da autora

6.5 RESPOSTA TÉRMOGÊNICA À NORADRENALINA (NE)

Os resultados da avaliação da temperatura corporal por telemetria são apresentados na figura 10 e mostram que a administração intraperitoneal de noradrenalina (NE, 0.01 mg/Kg) induziu a um aumento da temperatura corporal em animais de NN e de NR, porém o incremento foi maior no grupo NN (0.72 ± 0.07 vs $0.43\pm 0.05^{\circ}\text{C}$, $p<0.01$, Fig. 10A). O Índice térmico (área sob a curva) do intervalo entre

5 e 55 minutos (Figura 10B) demonstrou um maior aumento no grupo NN quando comparado com o grupo NR (26.57 ± 2.68 vs 15.10 ± 3.29 , $p < 0.05$). Assim, tanto a variação de temperatura corporal quanto o índice térmico após o desafio com noradrenalina apresentaram-se menores em machos criados em ninhadas reduzidas comparados aos machos criados em ninhadas normais, evidenciando uma resposta térmica menos acentuada frente à NE em animais de NR.

Figura 10 – Efeito da superalimentação neonatal sobre a variação da temperatura corporal em animais adultos machos frente a administração noradrenalina (NE, 0.01 mg/Kg, i.p).



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=8. A) Variação da temperatura corporal. B) Índice térmico do intervalo de 5 a 55 minutos após a administração de NE. *, $p < 0.05$, comparado com animais NN. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t-Student*).

6.6 GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 (GLP-1)

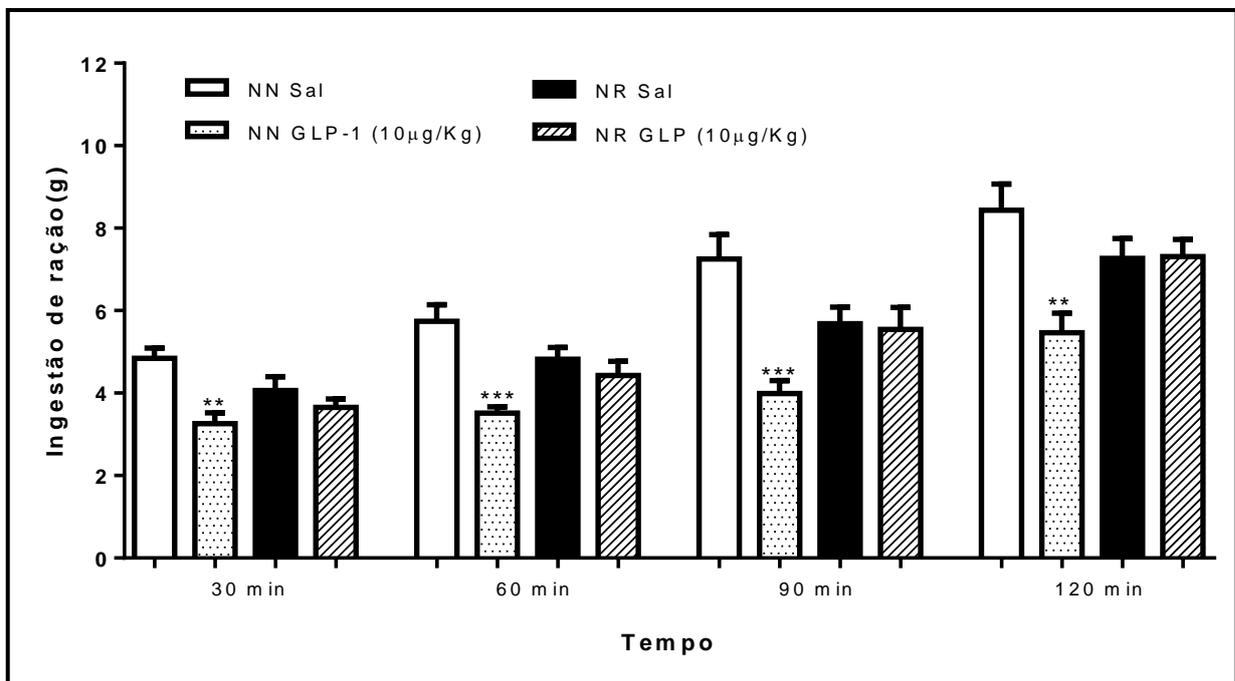
Os resultados dos testes com GLP-1 são apresentados abaixo.

6.6.1 Efeito do GLP-1 sobre a ingestão alimentar, glicemia e insulinemia

A figura 11 e os dados da tabela 8 mostram que a administração periférica de GLP-1 conseguiu reduzir a ingestão de alimentos no grupo de ninhada normal a partir dos 30 minutos após aplicação do hormônio até os 120 minutos, quando comparados

aos animais NN salina. A redução foi de 32.6% ($p<0.001$) aos 30 min., 38.8% ($p<0.001$) aos 60 min., 44.9% ($p<0.001$) aos 90 min. e 35.2% ($p<0.01$) aos 120 min. O GLP-1 não alterou significativamente a ingestão no grupo de ninhada reduzida em nenhum dos tempos analisados, sendo que os animais NR GLP-1 apresentaram respostas semelhantes aos animais que receberam salina. Os resultados tomados em conjunto são indicativos de resistência à ação anorexigênica desse hormônio no grupo NR.

Figura 11 - Efeito da superalimentação neonatal sobre o consumo de ração por ratos adultos frente ao desafio com *glucagon-like peptide-1* (GLP-1, 10 μ g/Kg).



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. $n=8$. *, $p<0.05$; ***, $p<0.001$ comparado com animais NN salina; #, $p<0.05$ comparado com animais NN GLP-1. Valores expressos como média \pm EPM (análise de variância ANOVA *two-way*, seguido de pós-teste de *Bonferroni*).

Tabela 8 - Análise de variância de duas vias da ingestão alimentar por ratos adultos frente aos desafio com *glucagon-like peptide-1* (GLP-1, 10 μ g/Kg, i.p).

Tempo (min)	Ninhada	Tratamento	Interação
30	$F_{1,31}=0.89$, $p=0.352$	$F_{1,31}=21.80$, $p<0.001$	$F_{1,31}= 1.38$, $p=0.247$
60	$F_{1,32}=3.23e-006$, $p=0.998$	$F_{1,32}=18.10$, $p<0.001$	$F_{1,32}= 8.84$, $p<0.010$
90	$F_{1,32}=0.0001386$, $p=0.990$	$F_{1,32}=12.96$, $p<0.010$	$F_{1,32}=10.90$, $p<0.010$
120	$F_{1,32}=0.47$, $p=0.494$	$F_{1,32}= 8.73$, $p<0.010$	$F_{1,32}= 9.25$, $p<0.010$

Fonte: Da autora

A análise da glicemia e insulinemia após 120 minutos da administração do GLP-1 revelou que esse hormônio foi capaz de elevar os níveis de insulina plasmática em 40.8% ($p < 0.05$) e, por conseguinte, reduzir a glicemia dos animais NN em 15.3% ($p < 0.001$, Tab. 9). Entretanto, o GLP-1 não foi capaz de causar alterações significativas nos animais NR, indicando resistência à ação hipoglicemiante e hiperinsulinêmica desse hormônio.

Tabela 9 - Efeito da superalimentação neonatal sobre as respostas glicêmica e insulinêmica de ratos machos adultos frente ao *glucagon-like peptide-1* (GLP-1, 10 μ g/Kg).

GRUPOS	GLICOSE (mg/dL)		INSULINA (ng/dL)	
	Salina	GLP-1 (10 μ g/Kg)	Salina	GLP-1 (10 μ g/Kg)
NN	146.69 \pm 2.95	124.28 \pm 3.45***	1.52 \pm 0.15	2.14 \pm 0.20*
NR	142.6 \pm 6.07	131.89 \pm 7.77	2.49 \pm 0.24	2.20 \pm 0.47

Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=8.. *, $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ comparados ao grupo NN salina. Valores expressos como média \pm EPM (Teste t Student).

6.6.2 Efeito do GLP-1 sobre a ativação de células encefálicas

Como descrito pelas Tabela 10 e 11 e ilustrado pelas fotomicrografias 12 a18, a avaliação através da análise estatística ANOVA *two way* demonstrou aumento do número de células positivas para c-Fos em todas as áreas avaliadas em animais NN após a administração de GLP-1, sendo que esse aumento foi de 139.7% ($p < 0.05$, Fig.12) na AP, 90.3% ($p < 0.05$, Fig. 13) no NTS, 78.0% ($p < 0.01$, Fig.14) no PVN, 97.6% ($p < 0.001$, Fig.15) no DMH, 77.7% ($p < 0.001$, Fig.16) no VMH, 76.5% ($p < 0.01$, Fig.17) no ARC e 68.2% ($p < 0.05$, Fig.18) na CeA, quando comparados com os animais salina.

Quanto ao grupo NR, não foi evidenciada nenhuma diferença estatística na expressão de c-Fos em nenhuma das áreas avaliadas quando comparou-se os grupos salina e GPL-1. No entanto, os animais NR GLP-1 apresentaram um número reduzidos de células imunorreativas para c-Fos no PVN ($p < 0.05$, Fig.15), DMH ($p < 0.01$, Fig. 15) e ARC ($p < 0.01$, Fig.17) quando foram comparados aos animais NN GLP-1.

Tomados em conjunto os resultados demonstram prejuízo na sinalização central do *glucagon-like peptide-1* em animais NR.

Tabela 10 - Efeitos da superalimentação neonatal e do *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1, 10µg/Kg i.p) na expressão de células positivas para c-fos no encéfalo de ratos adultos.

REGIÃO AVALIADA	NÚMERO DE NEURÔNIOS c-FOS REATIVOS				Valor de F
	NN Salina	NN GLP-1	NR Salina	NR GLP-1	
Área postrema	14.6±1.24	35.0±2.70*	26.17±4.57	32.8±6.18	F _{3,18} = 3.97
Núcleo do trato solitário	43.4±4.89	82.6±7.76**	67.8±9.45	67.0±4.53	F _{3,18} = 4.75
Núcleo paraventricular	50.2±6.21	89.4±6.03***	58.4±3.65	60.2±6.32#	F _{3,16} =9.14
Hipotálamo dorsomedial	46.8±5.88	92.5±5.05***	55.8±4.00	55.6±5.93##	F _{3,15} =12.99
Hipotálamo ventromedial	14.4±2.69	25.6±1.50*	19.2±2.61	18.8±2.33	F _{3,16} = 3.90
Núcleo arqueado	35.4±3.25	62.5±5.05**	41.8±5.02	39.0±2.96##	F _{3,15} = 7.88
Amígdala central	66.7±3.75	112.3±3.59*	97.0±7.64	88.6±14.65	F _{3,13} =3.52

Fonte: Da autora.

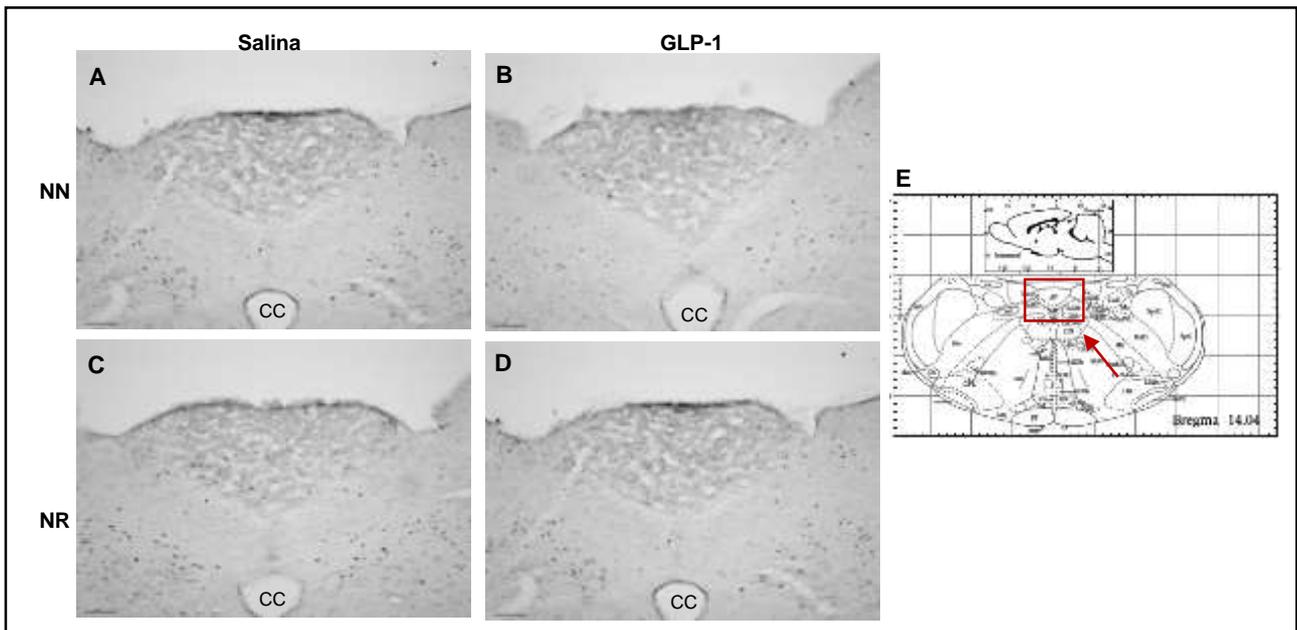
Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=5. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 comparado com animais NN salina; #, p<0.05, ##, p<0.01 comparado com animais NN GLP-1. Valores expressos como média ± EPM (análise de variância ANOVA two way, seguido de pós-teste de Bonferroni).

Tabela 11 - Análise de variância de duas vias do número de células positivas para c-FOS no encéfalo de ratos adultos (análise de variância ANOVA two way, seguido de pós-teste de Bonferroni).

REGIÃO AVALIADA	Valores de F		
	Ninhada	Tratamento	Interação
Área postrema	F _{1,18} =1.11, p=0.305	F _{1,18} = 9.20, p<0.010	F _{1,18} = 2.37, p=0.141
Núcleo do trato solitário	F _{1,18} =0.38, p=0.543	F _{1,18} = 0.72, p<0.050	F _{1,18} = 7.89, p<0.050
Núcleo paraventricular	F _{1,16} =3.43, p=0.082	F _{1,16} =13.09, p<0.010	F _{1,16} =10.89, p<0.010
Hipotálamo dorsomedial	F _{1,15} =6.78, p<0.050	F _{1,15} =18.05, p<0.001	F _{1,15} =18.37, p<0.001
Hipotálamo ventromedial	F _{1,16} =0.18, p=0.674	F _{1,16} = 5.35, p<0.050	F _{1,16} = 6.17, p<0.050
Núcleo arqueado	F _{1,15} =4.31, p=0.055	F _{1,15} = 8.70, p<0.010	F _{1,15} =13.18, p<0.010
Amígdala central	F _{1,13} =0.11, p=0.743	F _{1,13} =3.54, p=0.082	F _{1,13} = 7.47, p<0.050

Fonte: Da autora.

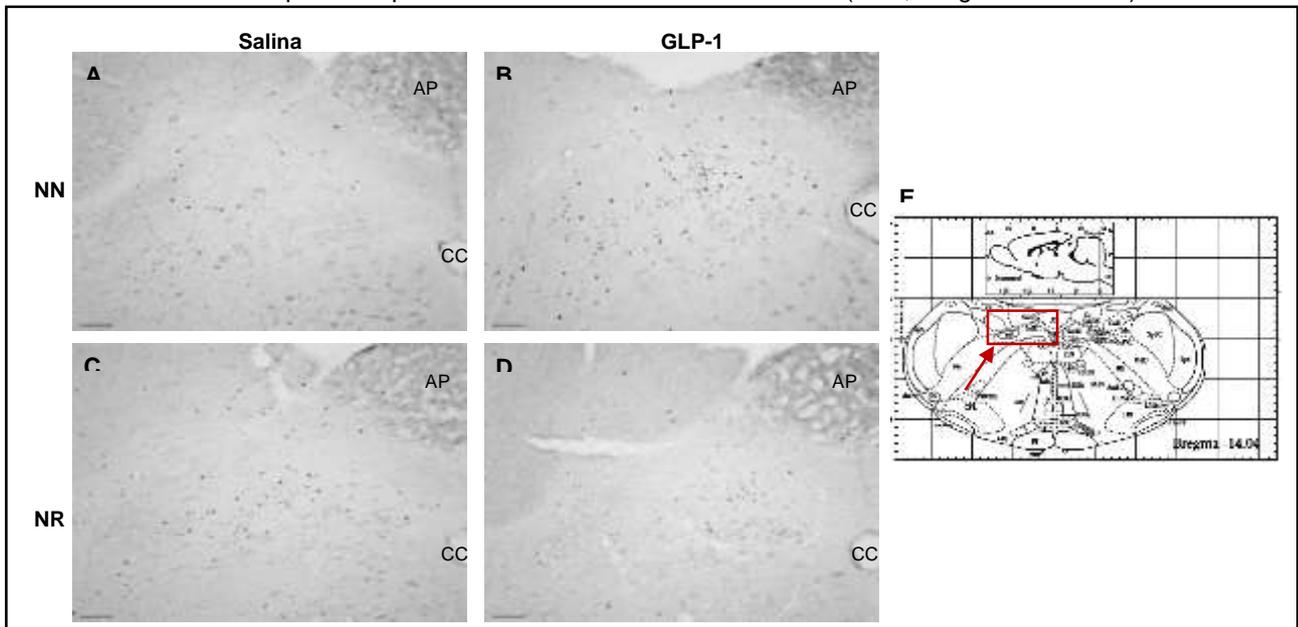
Figura 12 - Fotomicrografias representativas do efeito do *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos na **área postrema** (AP, Bregma:-14.04mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida, CC, canal central. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN GLP-1; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR GLP-1; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100 μ m.

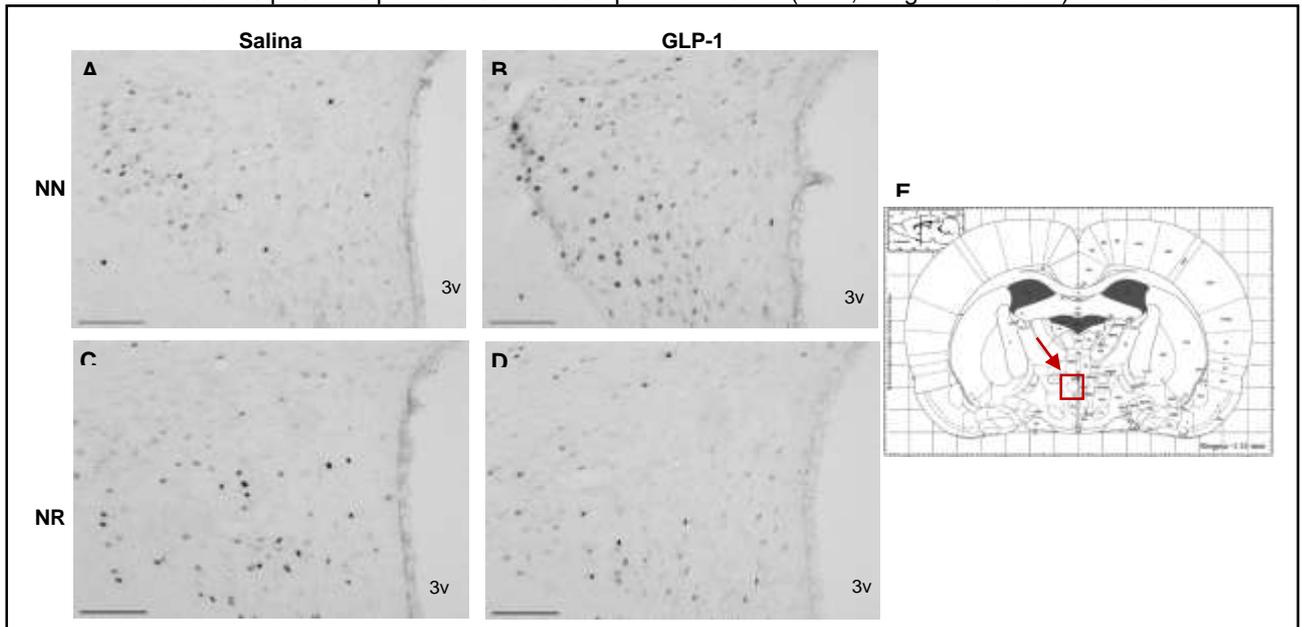
Figura 13 - Fotomicrografias representativas do efeito do *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos no **núcleo do trato solitário** (NTS, Bregma:-14.04mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida, CC, canal central, AP, área postrema. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN GLP-1; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR GLP-1; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100 μ m.

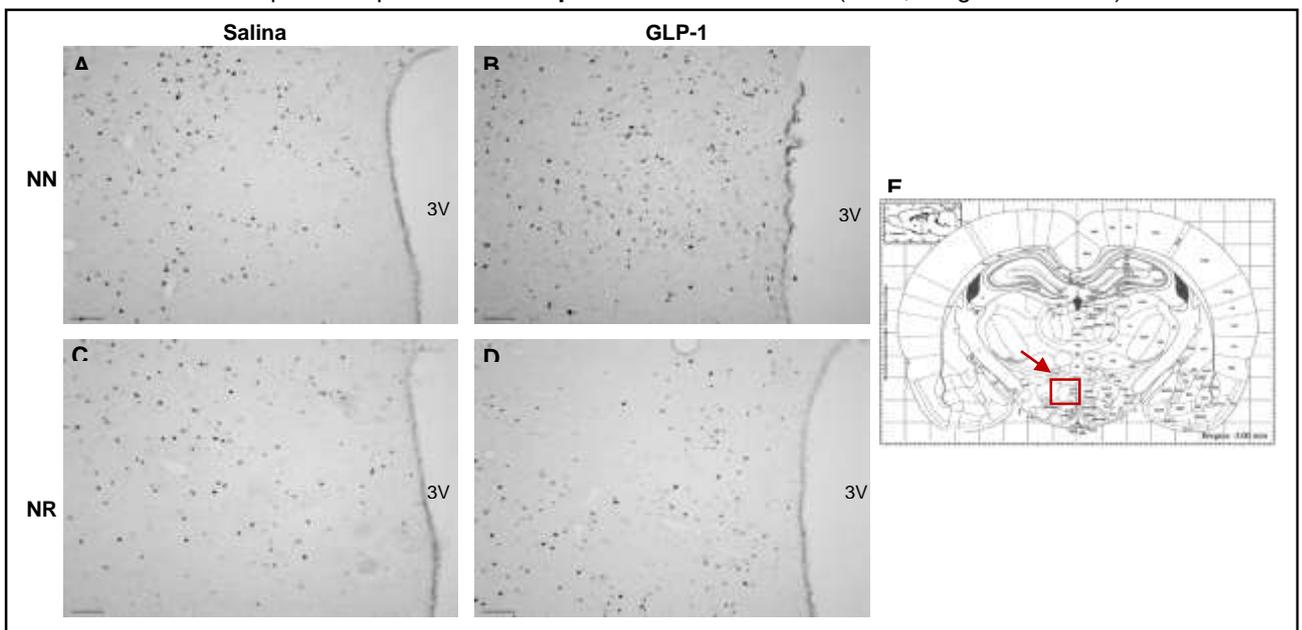
Figura 14 - Fotomicrografias representativas do efeito do *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos no núcleo paraventricular (PVN, Bregma:-1.32mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida, 3v, terceiro ventrículo. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN GLP-1; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR GLP-1; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100µm.

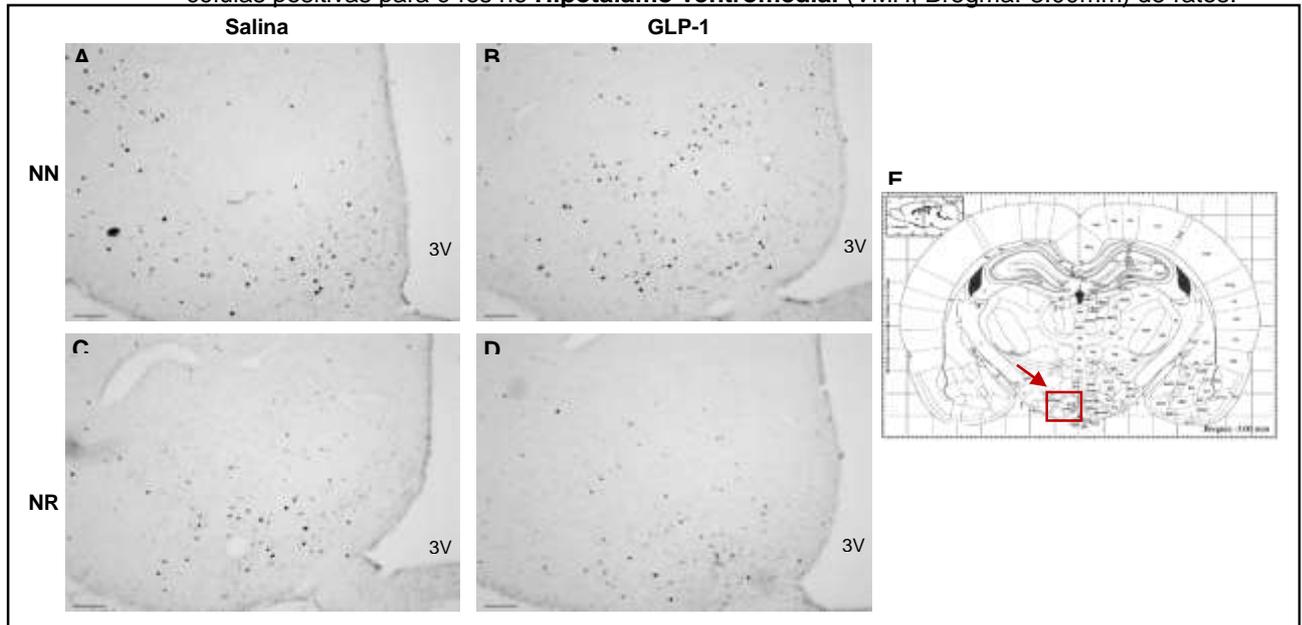
Figura 15 - Fotomicrografias representativas do efeito do *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos no **Hipotálamo dorsomedial** (DMH, Bregma:-3.00mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida, 3v, terceiro ventrículo. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN GLP-1; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR GLP-1; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100µm.

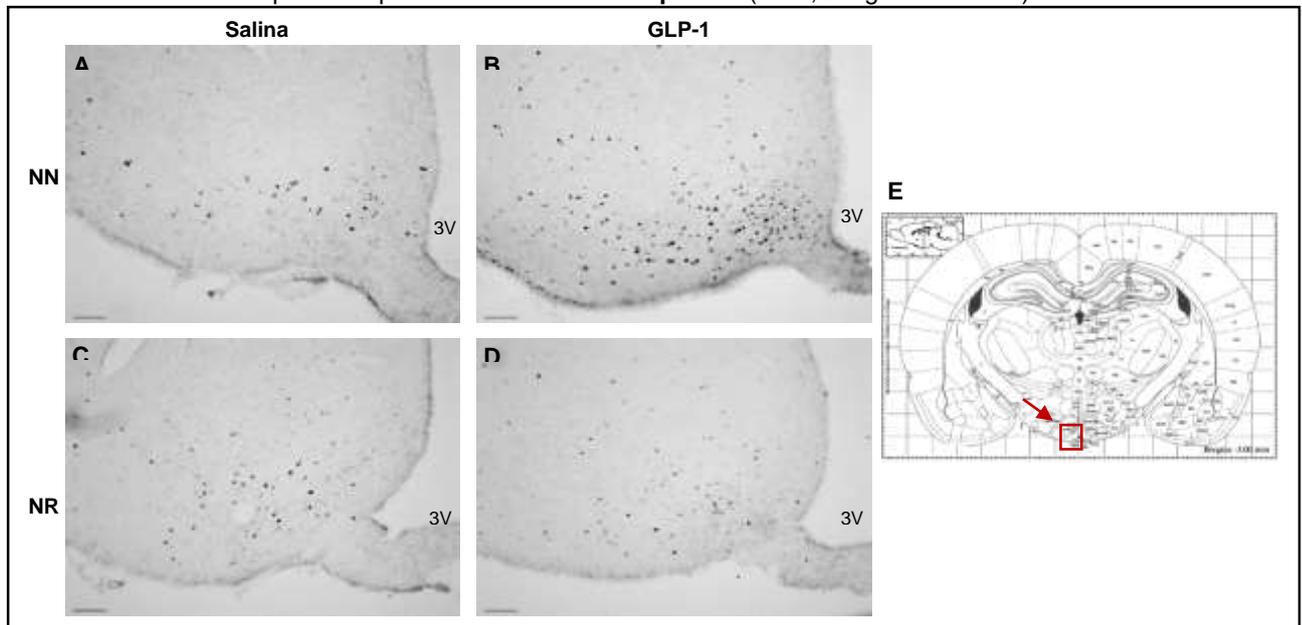
Figura 16 - Fotomicrografias representativas do efeito do *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos no **Hipotálamo ventromedial** (VMH, Bregma:-3.00mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida, 3v, terceiro ventrículo. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN GLP-1; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR GLP-1; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100 μ m.

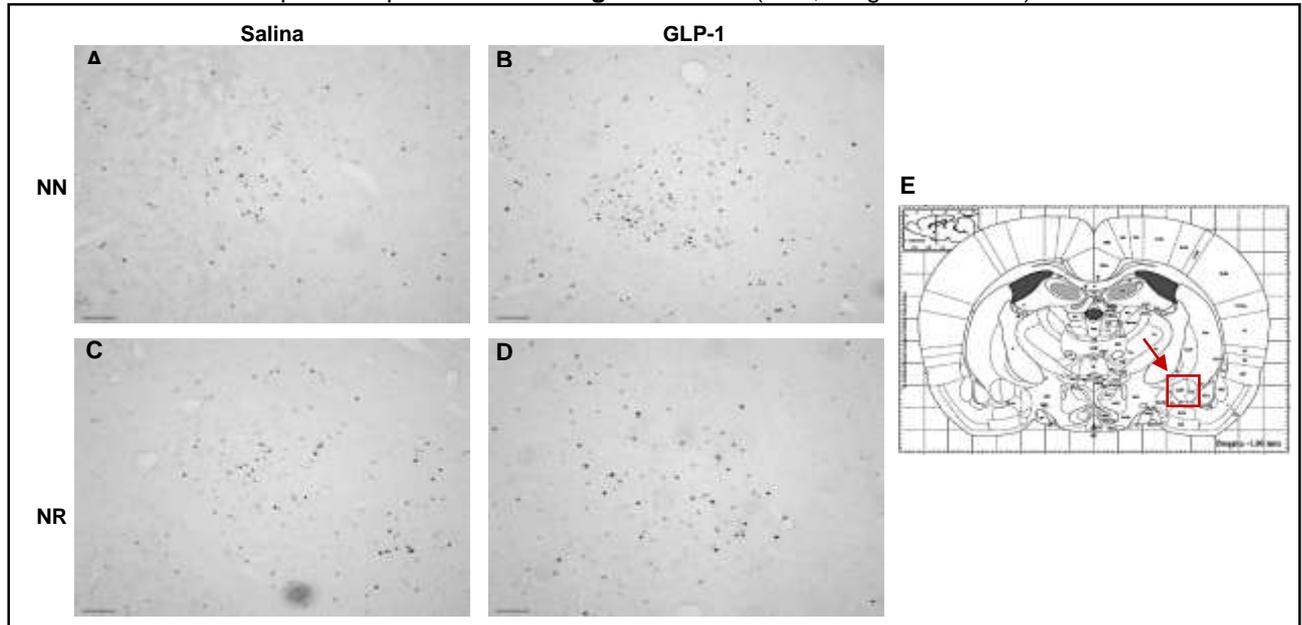
Figura 17 - Fotomicrografias representativas do efeito do *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos no **Núcleo arqueado** (ARC, Bregma:-3.00mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida, 3v, terceiro ventrículo. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN GLP-1; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR GLP-1; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100 μ m.

Figura 18 - Fotomicrografias representativas do efeito do *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) na expressão de células positivas para c-fos na **Amígdala central** (CeA, Bregma:-1.80mm) de ratos.



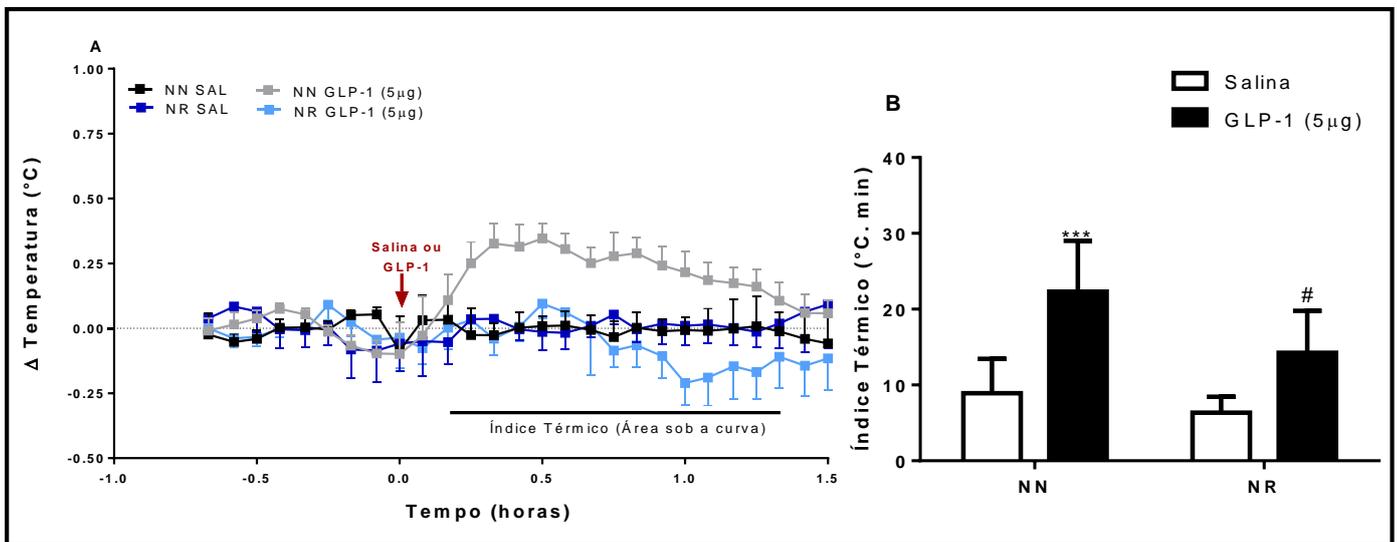
Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN GLP-1; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR GLP-1; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100 μ m. Fonte:

6.6.3 Efeito do GLP-1 sobre a temperatura corporal

A Figura 19A mostra a variação de temperatura ao longo das 1.5 horas após administração (i.c.v) de GLP-1. Os ratos NN que receberam GLP-1 (5 μ g/10 μ L, i.c.v) apresentaram um aumento mais acentuado na temperatura corporal quando comparado aos animais NR GLP-1. Essa diferença fica melhor evidenciada pelo índice térmico (Fig. 19B e tabela 11). A avaliação desse parâmetro demonstrou que, o GLP-1 foi capaz de elevar de forma significativa a temperatura corporal no grupo NN (8.90 \pm 1.61 para 22.31 \pm 2.52 $^{\circ}$ C.min, $p < 0.001$), o que não ocorreu no grupo NR (de 6.35 \pm 0.93 para 14.26 \pm 1.83 $^{\circ}$ C.min, $p > 0.05$). Quando compara-se os animais que receberam GLP-1, observa-se maior índice térmico nos animais NN (22.31 \pm 2.52 vs 14.26 \pm 1.83 $^{\circ}$ C.min, $p < 0.05$). Esses resultados tomados juntos evidenciam uma ação termogênica deficiente do GLP-1 no grupo NR.

Figura 19 - Efeito da superalimentação neonatal sobre a variação da temperatura corporal frente da administração intracerebroventricular de salina ou *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1, 5µg/10µL, i.c.v).



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=8. A) Variação da Temperatura corporal. B) Índice térmico do intervalo de 10 a 75 minutos após a administração de GLP-1. ***, p<0.001, comparado com animais NN salina; #, p<0.05, comparado com os animais NN GLP-1. Valores expressos como média ± EPM (ANOVA two-way seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*).

Tabela 12 – Análise de variância de duas vias do índice térmico do intervalo de 10 a 75 minutos em ratos adultos frente ao desafio com *glucagon-like peptide-1* (5µg/10µL, i.c.v).

Índice Térmico	Ninhada	Tratamento	Interação
	$F_{1,25} = 7.20, p < 0.050$	$F_{1,25} = 29.13, p < 0.001$	$F_{1,25} = 1.93, p = 0.176$

Fonte: Da autora

6.7 COLECISTOCININA-8 (CCK-8)

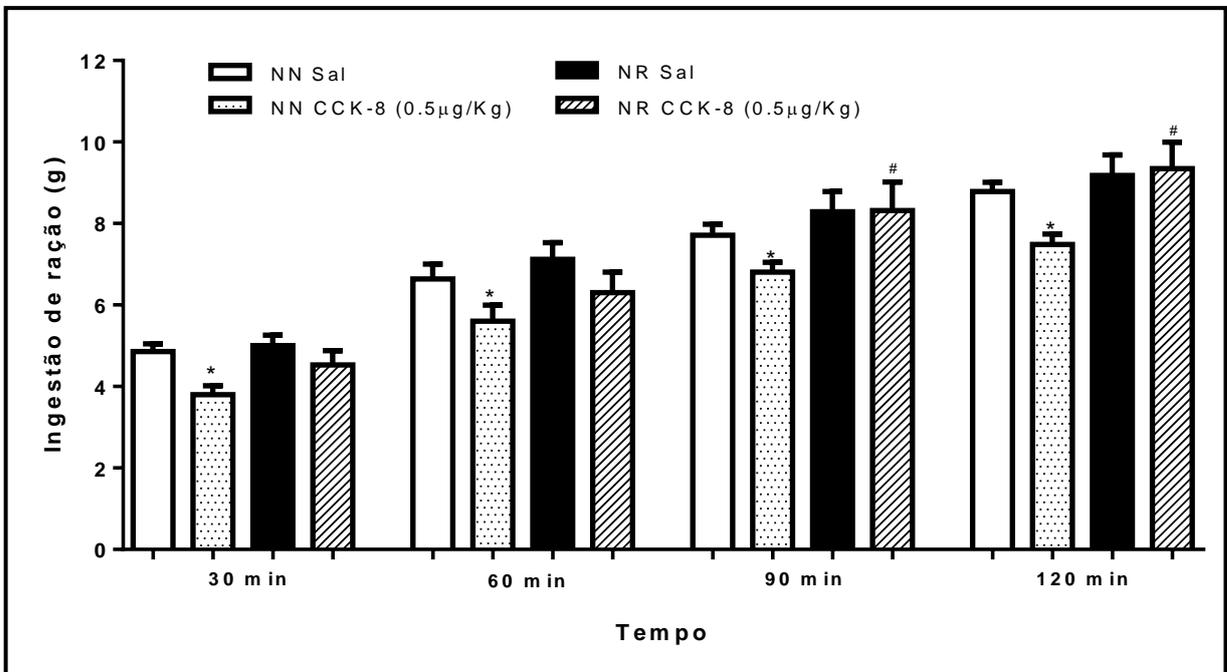
Os resultados dos testes com colecistocinina-8S são apresentados abaixo.

6.7.1 Efeito da CCK-8 sobre a ingestão alimentar

A figura 20 e os dados da tabela 13 mostram que a ingestão cumulativa de ração diminuiu significativamente 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de CCK-8 em animais que foram criados em ninhada grande (NN). A colecistocinina reduziu a ingestão desses animais em 21.7% aos 30 minutos (p<0.05), 15.6% aos 60

minutos ($p < 0.05$), 11.7% aos 90 minutos ($p < 0.05$) e 12.2% aos 120 minutos ($p < 0.05$). Os animais criados em ninhada pequena não apresentaram alteração significativa na ingestão de ração após a administração de CCK-8, em nenhum dos tempos avaliados. Os animais de ninhada grande que receberam CCK-8 apresentaram menor ingestão cumulativa nos tempos de 90 e 120 min quando comparados com os animais de ninhada pequena que receberam CCK-8 (6.80 ± 0.24 vs 8.31 ± 0.69 , $p < 0.05$ aos 90min e 7.71 ± 0.30 vs 9.34 ± 0.64 , $p < 0.05$ aos 120 min.). Esses resultados são indicativo de resistência à ação anorexigênica desse hormônio.

Figura 20 - Efeito da superalimentação neonatal sobre o consumo de ração em ratos adultos frente ao desafio com colecistocinina-8 (CCK-8, $0.5 \mu\text{g}/\text{Kg}$).



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. $n=8$. *, $p < 0.05$ comparado com animais NN salina; ###, $p < 0.001$ comparado com animais NN CCK-8. Valores expressos como média \pm EPM (análise de variância ANOVA *two-way*, seguido de pós-teste de *Bonferroni*).

Tabela 13 – Análise de variância de duas vias da ingestão alimentar por ratos adultos frente aos desafio com colecistocinina-8 (CCK, 0.5µg/Kg, i.p).

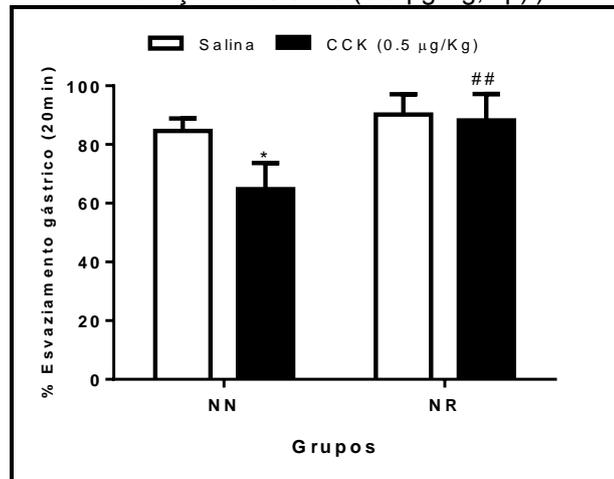
Tempo (min)	Ninhada	Tratamento	Interação
30	$F_{1,32}=2.88, p=0.099$	$F_{1,32}=8.77, p<0.010$	$F_{1,32}= 1.27, p=0.026$
60	$F_{1,29}=3.23, p=0.082$	$F_{1,29}=9.87, p<0.010$	$F_{1,29}= 1.29, p=0.264$
90	$F_{1,29}=7.65, p<0.010$	$F_{1,29}=5.90, p<0.050$	$F_{1,29}=3.59, p=0.068$
120	$F_{1,28}=9.08, p<0.010$	$F_{1,28}= 5.32, p<0.010$	$F_{1,28}= 3.55, p;0.070$

Fonte: Da autora

6.7.2 Efeito da CCK-8 sobre o esvaziamento gástrico

A administração intraperitoneal de CCK-8S (0.05µg/Kg, Fig. 21) reduziu significativamente a porcentagem de esvaziamento gástrico no animal NN (+64.80±4.46%) em comparação com o animal salina (+84.59±2.13%, $p <0.05$). O grupo NR não apresentou alteração significativa entre os animais no esvaziamento gástrico após a administração de CCK-8S (fator tamanho da ninhada: $F_{1,14} = 16.31, p<0.01$; fator de tratamento: $F_{1,14} = 9.18, p<0.01$; fator interação: $F_{1,14} = 6.11, p <0.05$). Pode-se observar ainda que os animais que receberam CCK-8 apresentam diferenças estatísticas, sendo que os animais NN apresentam menor taxa de esvaziamento gástrico quando comparados com os animais NR (64.80±4.46 vs 88.22±4.00%, $p<0.01$).

Figura 21 - Efeito da superalimentação neonatal sobre esvaziamento gástrico em ratos machos adultos após 20 minutos da administração de CCK-8 (0.5 µg/Kg, i.p.).



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=8. *, p<0.05 comparado com animais NN salina; ###, p<0.001 comparado com animais NN CCK-8. Valores expressos como média ± EPM (análise de variância ANOVA *two-way*, seguido de pós-teste de *Bonferroni*).

6.7.3 Efeito da CCK-8 sobre a ativação de áreas encefálicas

Como descrito pelas Tabela 14 e 15 e ilustrado pelas fotomicrografias (Fig. 22-28), a avaliação através da análise estatística ANOVA *two way* demonstrou aumento do número de células positivas para c-fos na AP em animais NN após a administração de CCK (p<0.05, Fig. 22), NTS (p<0.05, Fig. 23), PVN (p<0.05, Fig. 24), DMH (p<0.001, Fig. 25), ARC (p<0.05, Fig. 27) e CeA (p<0.05, Fig. 28) após a administração de CCK. Não houve alteração significativas no VMH do grupo NN após desafio com CCK (p=0.79, Fig. 26).

Quanto ao grupo NR, não foi evidenciada nenhuma diferença estatística na expressão de c-fos após o desafio com a CCK em nenhuma das áreas avaliadas quando comparado ao grupo NR salina.

A análise ainda demonstrou um aumento na células imunorreativas para c-fos no grupo NR salina quando comparado ao grupo NN salina no PVN (p<0.001, Fig. 24), DMH (p<0.001, Fig. 25), ARC (p<0.05, Fig. 27) e na CeA (p<0.05, Fig. 28). Tomados em conjunto os resultados demonstram prejuízo na sinalização central da

colecistocinina em animais NR, bem como alterações basais ocasionadas pela superalimentação neonatal.

Tabela 14 - Efeito da superalimentação neonatal e da colecistocinina-8 (CCK-8, 0.5µg/Kg i.p.) sobre a expressão de células positivas para c-fos no encéfalo de ratos adultos.

REGIÃO AVALIADA	NÚMERO DE NEURÔNIOS c-FOS REATIVOS				
	NN Salina	NN CCK	NR Salina	NR CCK	Valor de F
<i>Área postrema</i>	19.5±2.21	39.2±3.11*	19.5±4.46	19.1±4.48#	F3,14= 5.52
<i>Núcleo do trato solitário</i>	26.6±5.23	86.6±2.92*	69.2±16.5	72.7±12.98	F3,12= 4.90
<i>Núcleo paraventricular</i>	12.2±2.17	30.2±3.42*	45.5±3.39***	37.6±4.82	F3,18=14.23
<i>Hipotálamo dorsomedial</i>	24.4±4.25	78.8±4.24***	72.2±5.93***	61.6±7.38	F3,17=16.39
<i>Hipotálamo ventromedial</i>	4.8±0.30	5.2±1.46	4.75±1.25	6.0±0.63	F3,16= 0.35
Núcleo arqueado	3.5±1.25	18.5±1.55*	23.8±4.39**	20.5±1.19	F3,13= 9.76
<i>Amígdala central</i>	30.0±2.79	64.0±4.11**	53.4±2.80*	55.6±6.72	F3,16=7.52

Fonte: Da autora.

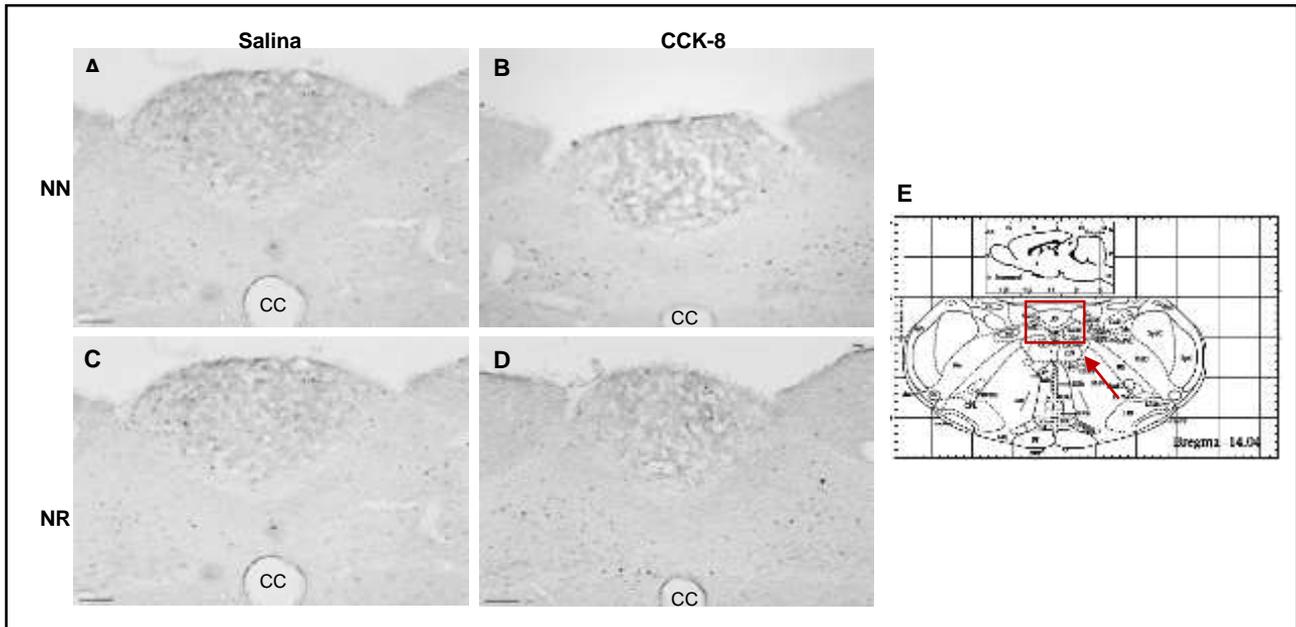
Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=5. *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001 comparado com animais NN salina; #, p<0.05 comparado com animais NN CCK. Valores expressos como média ± EPM (análise de variância ANOVA two way, seguido de pós-teste de Bonferroni).

Tabela 15 - Análise de variância de duas vias do número de células positivas para c-FOS no encéfalo de ratos adultos (análise de variância ANOVA two way, seguido de pós-teste de Bonferroni).

REGIÃO AVALIADA	Valores de F		
	Ninhada	Tratamento	Interação
<i>Área postrema</i>	F _{1,14} = 5.92, p<0.050	F _{1,14} = 5.53, p<0.050	F _{1,14} = 5.52, p<0.050
<i>Núcleo do trato solitário</i>	F _{1,12} = 1.69, p=0.217	F _{1,12} = 8.25, p<0.050	F _{1,12} = 6.53, p<0.050
<i>Núcleo paraventricular</i>	F _{1,18} =29.68, p<0.001	F _{1,18} = 1.84, p=0.191	F _{1,18} =11.92, p<0.010
<i>Hipotálamo dorsomedial</i>	F _{1,17} = 6.81, p<0.050	F _{1,17} =13.93, p<0.010	F _{1,17} =30.53, p<0.001
<i>Hipotálamo ventromedial</i>	F _{1,16} = 0.13, p=0.714	F _{1,16} = 0.70, p=0.412	F _{1,16} = 0.21, p=0.652
Núcleo arqueado	F _{1,13} =15.06, p<0.010	F _{1,13} = 4.14, p=0.062	F _{1,13} =10.14, p<0.050
<i>Amígdala central</i>	F _{1,16} =13.24, p<0.010	F _{1,16} = 2.28, p=0.150	F _{1,16} =10.14, p<0.010

Fonte: Da autora.

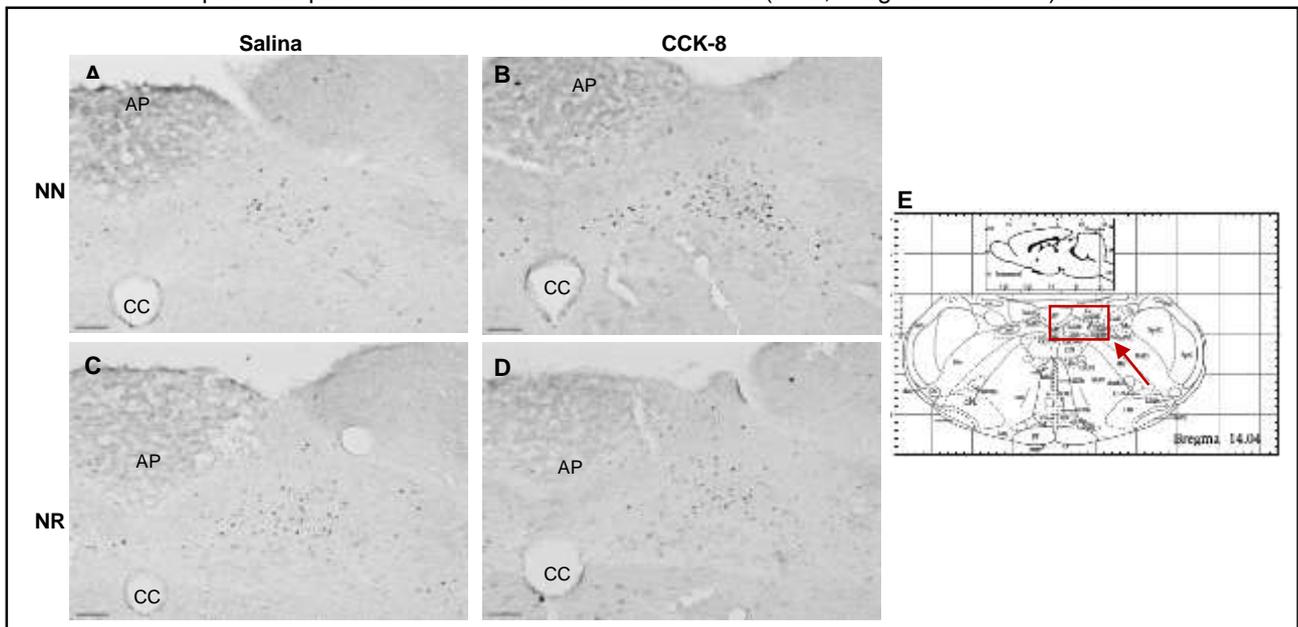
Figura 22 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CCK-8) na expressão de células positivas para c-fos na **área postrema** (AP, Bregma:-14.04mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida, CC, canal central. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN CCK-8; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR CCK-8; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100 μ m.

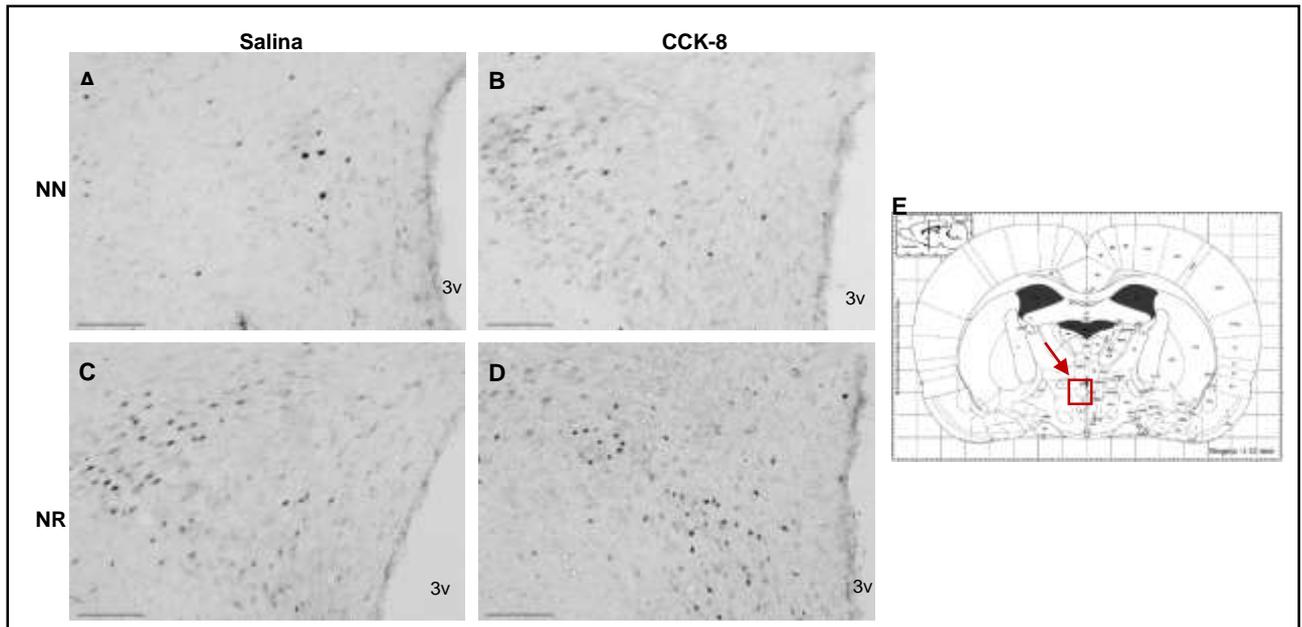
Figura 23 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CCK-8) na expressão de células positivas para c-fos no **Núcleo do trato solitário** (NTS, Bregma:-14.04mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida, CC, canal central, AP, área postrema. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN CCK-8; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR CCK-8; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100 μ m.

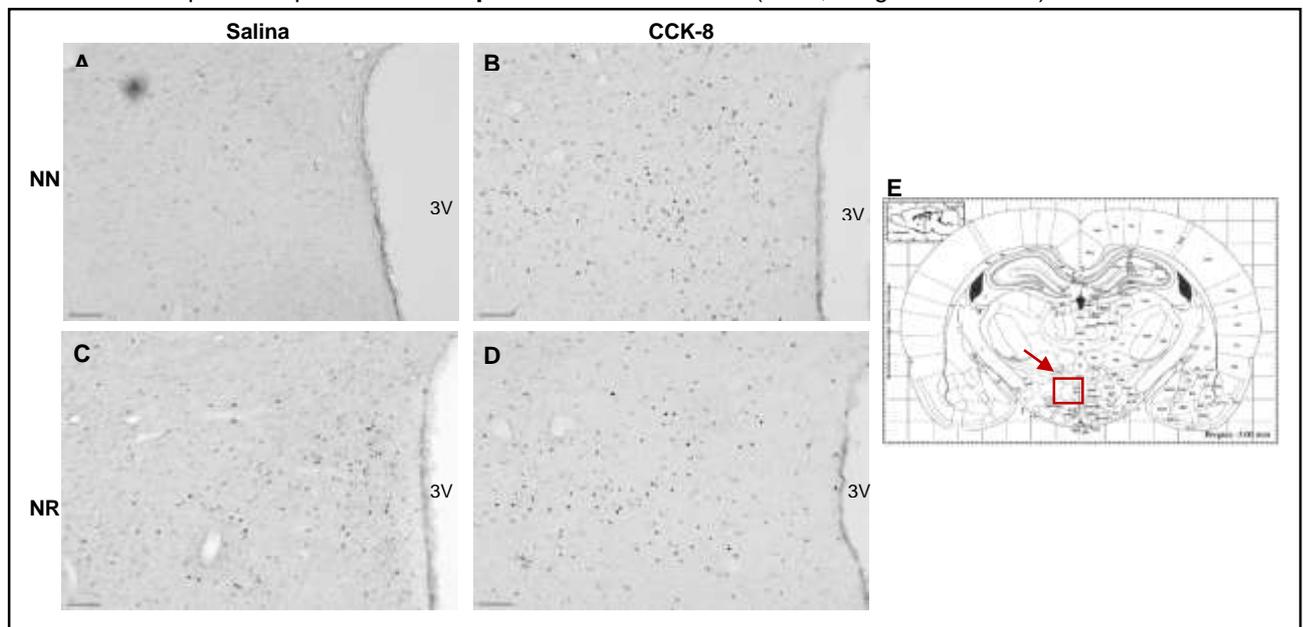
Figura 24 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CCK-8) na expressão de células positivas para c-fos no **núcleo paraventricular** (PVN, Bregma: -1.32mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida, 3v, terceiro ventrículo. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN CCK-8; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR CCK-8; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100µm. Fonte:

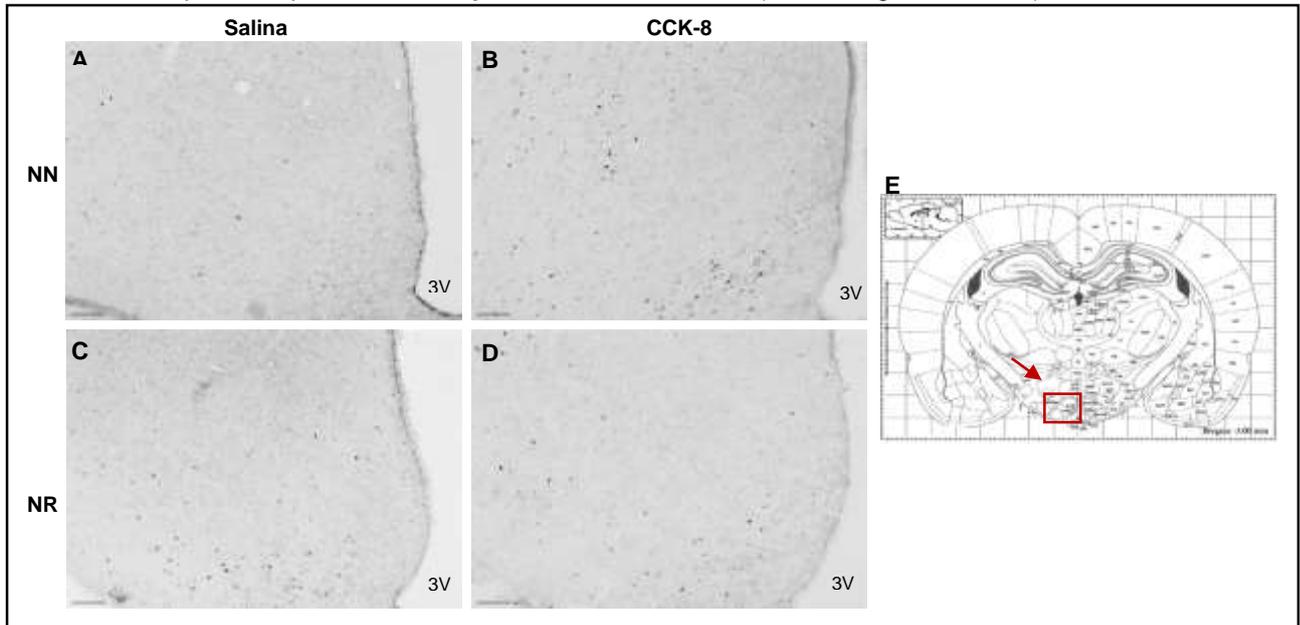
Figura 25 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CCK-8) na expressão de células positivas para c-fos no **Hipotálamo dorsomedial** (DMH, Bregma:-3.00 mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida, 3v, terceiro ventrículo. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN CCK-8; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR CCK-8; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100µm.

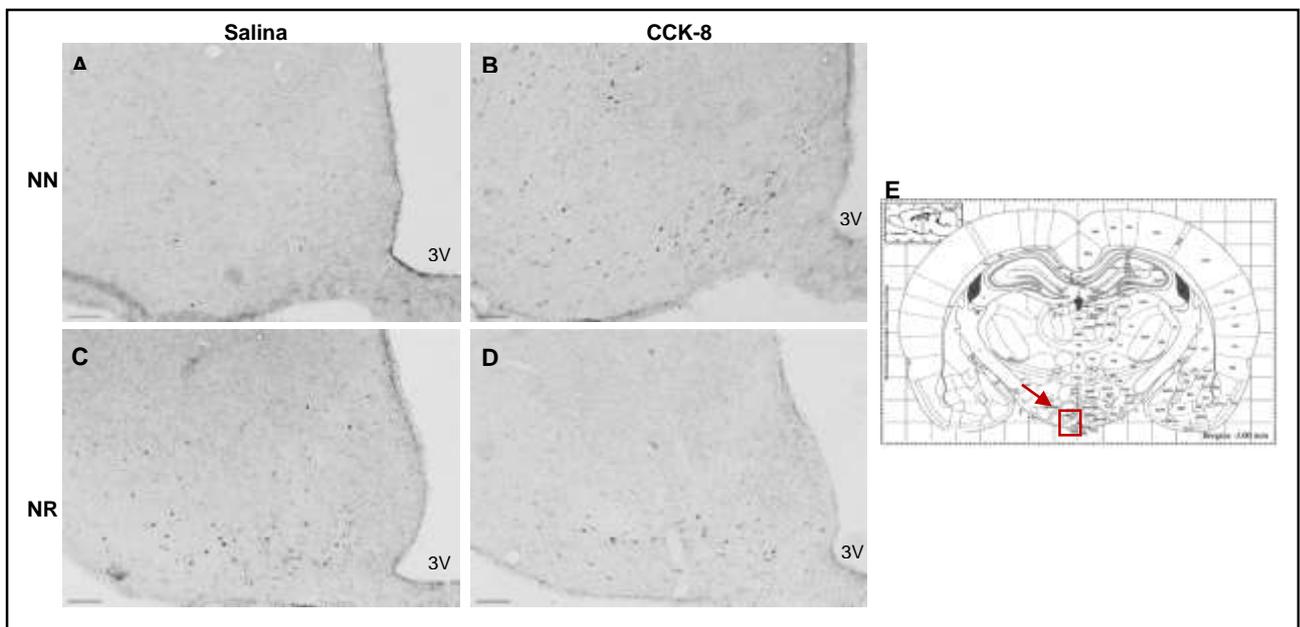
Figura 26 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CCK-8) na expressão de células positivas para c-fos no **Hipotálamo ventromedial** (VMH, Bregma:-3.00mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida, 3v, terceiro ventrículo. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN CCK-8; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR CCK-8; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100µm.

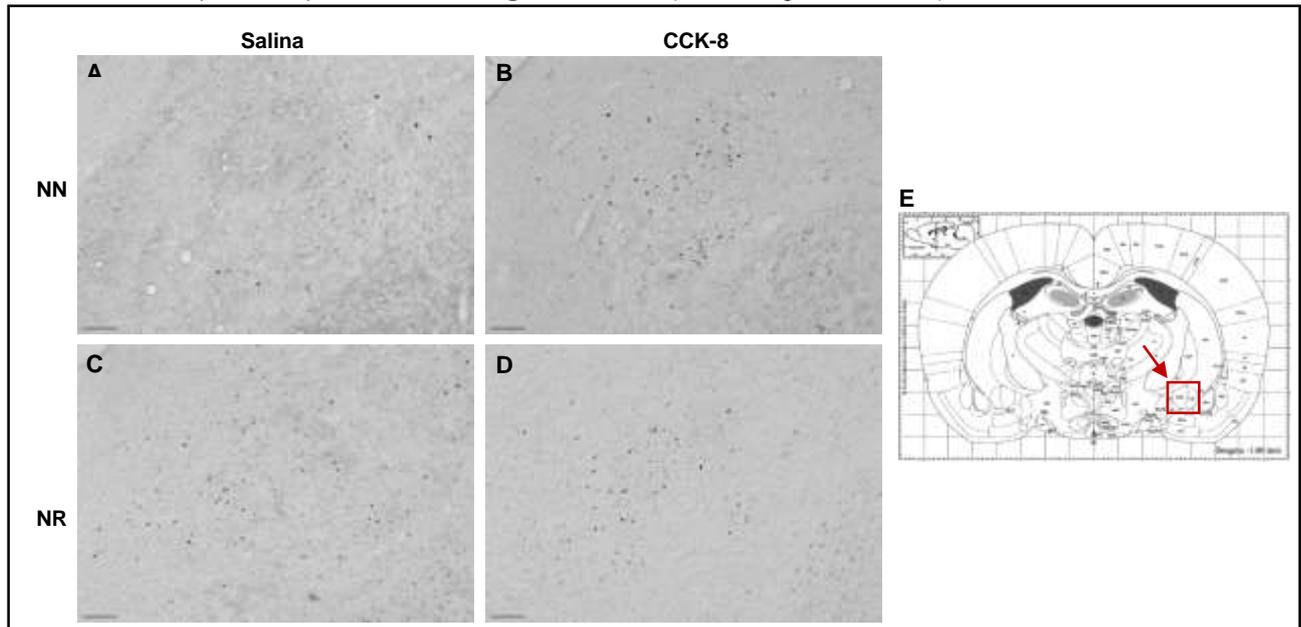
Figura 27 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CCK-8) na expressão de células positivas para c-fos no **Núcleo arqueado** (ARC, , Bregma:-3.00mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida, 3v, terceiro ventrículo. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN CCK-8; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR CCK-8; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100µm.

Figura 28 - Fotomicrografias representativas do efeito da colecistocinina-8 (CCK-8) na expressão de células positivas para c-fos na **amígdala central** (CeA, Bregma:-1.80mm) de ratos.



Fonte: Da autora.

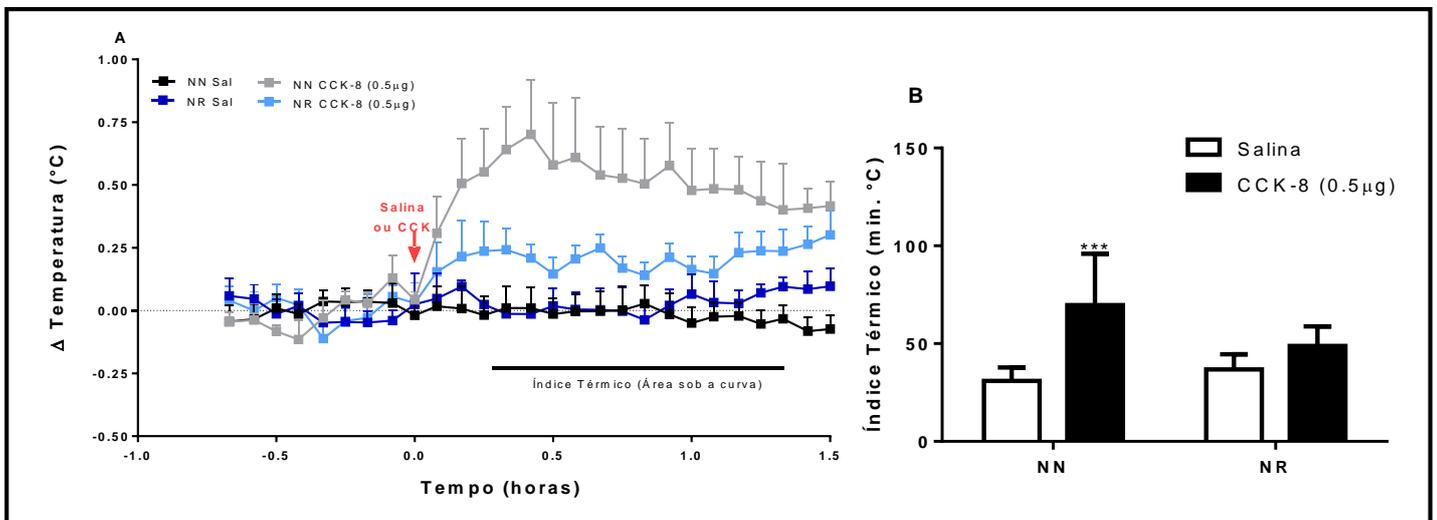
Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=5. (A) Grupo NN Salina; (B) Grupo NN CCK-8; (C) Grupo NR Salina; (D) Grupo NR CCK-8; (E) Esquema do corte encefálico. As barras nas fotomicrografias representam 100 μ m.

6.7.4 Efeito da CCK-8 sobre a temperatura corporal

Os resultados da avaliação da temperatura corporal demonstraram que a administração de CCK-8 induziu um aumento da temperatura corporal em animais de NN, mas não em animais NR (Figura 29A). O Índice térmico (área sob a curva) do intervalo entre 10 e 75 minutos (Figura 29B) demonstrou que a CCK foi capaz de elevar de forma significativa o índice térmico nos animais NN (de 30.88 ± 2.61 para $69.68 \pm 11.73^\circ\text{C}\cdot\text{min}$, $p < 0.001$). No entanto, esse aumento não foi observado nos animais NR que receberam CCK-8 (36.76 ± 3.18 no NR Sal e $48.84 \pm 3.50^\circ\text{C}\cdot\text{min}$ no NR CCK-8, $p > 0.05$). Esses resultados tomados juntos evidenciam uma ação deficiente da CCK no grupo NR.

Os resultados da análise de variância ANOVA Two-way para o índice térmico são descritos na Tabela 16.

Figura 29 - Efeito da superalimentação neonatal sobre a variação da temperatura corporal frente a administração intracerebroventricular de salina ou Colecistocinina-8 (CCK-8, 0.5µg/5µL, i.c.v).



Fonte: Da autora.

Nota: NN, ninhada normal; NR, ninhada reduzida. n=8. A) Variação da Temperatura corporal. B) Índice térmico do intervalo de 10 a 180 minutos após a administração de CCK-8. ***, p<0.01, comparado com animais NN salina. Valores expressos como média ± EPM (ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*).

Tabela 16 - Análise de variância de duas vias do índice térmico do intervalo de 10 a 180 minutos após a administração de colecistocinina-8 (CCK-8, 0.5µg/5µL, i.c.v) em ratos adultos.

Índice Térmico	Ninhada	Tratamento	Interação
	$F_{1,22} = 1.92, p=0.179$	$F_{1,22}=22.25, p<0.001$	$F_{1,22}=6.13, p<0.050$

Fonte: Da autora

7 DISCUSSÃO

O ambiente nutricional neonatal certamente desempenha um papel importante na programação de mecanismos que regulam a ingestão alimentar e a homeostase energética na vida adulta. Tem sido sugerido que os hormônios são capazes de transmitir sinais ao organismo em desenvolvimento em resposta a alterações no ambiente nutricional e podem ser a base para potenciais respostas mal adaptativas em decorrência de perturbações metabólicas precoces (COLLDEN et al., 2014).

No presente trabalho foi demonstrado que a alimentação excessiva decorrente do maior acesso ao leite por meio da redução do número de filhotes na ninhada alterou o perfil metabólico da prole, promovendo sobrepeso que perdurou ao longo da vida. Este trabalho também apresenta dados relevantes que nos permitem sugerir que, a perpetuação do fenótipo de sobrepeso da infância até a fase adulta nesse modelo, seja decorrente, dentre outros fatores, de alterações endócrinas e neurais que levaram à uma resistência central e periférica à ação da colecistocinina-8 e do *glucagon-like peptide-1*, hormônios com papéis fundamentais na homeostase energética.

Os animais criados em pequenas ninhadas (NR) são expostos à superalimentação devido à maior disponibilidade de leite, com elevado teor de triglicerídeos, durante a lactação (CUNHA et al., 2009; SHANKAR et al., 2008), que leva a um aumento da massa corporal a partir da primeira semana pós-natal (CARVALHO et al., 2015; HABBOUT et al., 2013). Uma série de estudos forneceram evidências significativas de que mudanças na nutrição perinatal programam o desenvolvimento da rede neural hipotalâmica que regula o apetite e a ingestão. Isso ocorre pois o desenvolvimento da rede hipotalâmica reguladora do apetite em roedores ocorre predominantemente após o nascimento, quando as projeções hipotalâmicas são completamente formadas (GROVE; SMITH, 2003; KAGOTANI et al., 1989; McMILLEN; ADAM; MUHLHAUSLER, 2005). O aumento da ingestão de leite por filhotes NR, pelo menos em parte, contribui para a alteração do fenótipo metabólico, embora outras possibilidades como comportamento materno, atividade de

filhotes e efeito dos nutrientes não possam ser excluídos (CARVALHO et al., 2015; FIOROTTO et al., 1991, ENES-MARQUES; GIUSTI-PAIVA, 2018).

Em decorrência da ingestão elevada no período lactacional e consistente com trabalhos anteriores (BEI et al., 2015; PLAGEMANN et al., 1992, 1999a e b), os dados desse estudo também mostraram que, quando a sobrenutrição pós-natal foi induzida em ratos houve aumento de ganho de peso e deposição de gordura (aumento de adipócitos em número e tamanho), dislipidemia, hiperleptinemia e disfunção no metabolismo glicêmico característico de resistência à insulina.

O bloqueio da sinalização da insulina, o aumento dos níveis de ácidos graxos circulantes e de algumas adipocinas, o aumento do estresse oxidativo, integração e projeções anormais de neurônios orexigênicos e anorexigênicos, prejuízo no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal têm sido mecanismos propostos para fundamentar a resistência à insulina (IR) em animais criados em pequenas ninhadas (CONCEIÇÃO et al., 2013; DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2007; HABBOUT et al., 2013; PLAGEMANN et al., 2010). Estudos anteriores demonstraram que a superalimentação pós-natal precoce altera o perfil lipídico, elevando os níveis séricos de colesterol e suas frações e levando ao depósito de gordura visceral (HAHN, 1984; NASCIMENTO et al., 2008), um achado que confirmamos em nosso modelo. Manco et al. (2004) afirmam que esse quadro dislipidêmico é relacionado ao aumento na captação de ácidos graxos associado à oxidação deficiente que leva ao maior acúmulo de gordura nos animais criados em ninhadas reduzidas. Esses ácidos graxos elevados na circulação também tem sido responsabilizados pela redução no transporte de glicose, prejudicando a sinalização da insulina no músculo esquelético e tecido adiposo, resultando em diminuição da glicogênese nestes tecidos e aumento da glicose sérica. Assim, esse aumento na glicose sérica e prejuízo na sinalização de insulina levam eventualmente à IR que, por sua vez, resulta na inibição da lipólise, aumentando ainda mais os níveis de ácidos graxos circulante e a deposição de gordura causando um ciclo vicioso que pode levar ao diabetes *mellitus* tipo 2 e obesidade (BEI et al., 2015).

Os animais superalimentados apresentaram ainda níveis plasmáticos de leptina maiores, resultado consistente com o aumento da adiposidade, demonstrada histologicamente pelo aumento e tamanho dos adipócitos brancos. A leptina é

produzida principalmente pelo tecido adiposo e é responsável pelo controle da ingestão alimentar, atuando em células neuronais do hipotálamo no sistema nervoso central promovendo a redução da ingestão alimentar, aumento do gasto energético, além de regular a função neuroendócrina e o metabolismo da glicose e de gorduras (SUZUKI et al., 2010). Concentrações elevadas de leptina circulantes podem induzir um quadro de resistência à leptina, que se estabelece em animais NR e que pode ser decorrente da resistência hipotalâmica à ação anorexigênica deste hormônio, devido ao prejuízo no seu transporte pela barreira hematoencefálica ou anormalidades nos receptores e/ou na sinalização pós-receptor (JEQUIER, 2002, LÓPEZ et al., 2007). É descrita uma associação entre resistência à leptina e resistência à insulina, devido ao *cross-talking* nas vias de sinalização de insulina e leptina, em especial no aumento da SOCS3 (supressor da sinalização de citocinas 3), que bloqueia a fosforização da JAK2 (*janus kinase 2*), segundo mensageiro da via de sinalização da leptina e também da PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase), enzima importante na via de sinalização de insulina (HOWARD; FLIER, 2006). Assim, há bloqueio da sinalização de ambas as vias e tais hormônios deixam de exercer seu papel com eficácia. Hiperleptinemia associada à resistência à insulina podem também estar relacionadas a gênese da obesidade (AHIMA et al., 2000; AHIMA; OSEI, 2004).

A literatura tem apresentado dados inconsistentes quanto à hiperfagia em animais superalimentados precocemente. Vários grupos não notaram diferenças na ingestão de alimentos entre os ratos adultos NN e NR e nos casos em que a hiperfagia foi relatada, esta é de curta duração (LÓPEZ et al., 2007; MOZES et al., 2004). Os dados aqui apresentados revelam que a elevação na ingestão desaparece ao normalizar-se para o peso do animal, ou seja, que animais obesos e normais apresentam consumo alimentar semelhantes entre si na fase adulta, corroborando com os achados de outros autores (SPENCER; TILBROOK, 2009; STEFANDINIS; SPENCER, 2012; XIAO et al., 2009). Esses dados indicam que o sobrepeso dos animais NR resulta não do excesso de alimentos, mas sim de outras alterações possivelmente relacionadas ao metabolismo e gasto energético decorrentes da modificação nutricional precoce a qual foram sujeitos. Mozes et al. (2004) justificam essa discrepância ao menor número de filhotes na ninhada reduzida (3-4 vs 10-12

filhotes/ninho) ou ao fato dos animais NR apresentarem maior ingestão devido ao seu maior peso. Estudos experimentais avaliaram a longo prazo as consequências da superalimentação precoce em vários modelos de obesidade e também mostraram resultados conflitantes. Foram apresentadas provas de que a restrição alimentar após o desmame em ratos machos obesos a partir de ninhadas pequenas inibe o ganho de peso e diminui o peso da gordura epididimal (BASSETT; CRAIG, 1988; LIU et al., 2013). Por outro lado, camundongos obesos ob/ob (deficientes em leptina) e ratos obesos *Zucker* (resistentes à leptina), com predisposição genética à obesidade, demonstraram uma capacidade de desenvolver obesidade ao longo de toda a vida, apesar de deficiência nutricional induzida pelo aumento do tamanho da ninhada (CLEARY; VASSELLI; GREENWOOD, 1980; JOHNSON et al., 1973). Tomados juntos esses dados reforçam a hipótese de que a manutenção do sobrepeso vai além de uma ingestão alimentar excessiva que pode ser revertidas por restrição calórica, mas que interferentes endócrinos exercem um papel relevante sobre a manutenção do fenótipo de sobrepeso.

Stefandinis e Spencer (2012) demonstraram em seus estudos que os ratos criados em pequenas ninhadas reduziram o gasto energético em comparação com animais de ninhada grande, até pelo menos PND25-30, que segundo elas foi o fator principal que contribuiu para estes ratos manterem maior peso e massa gorda, mesmo na ausência de hiperfagia. Essa redução na taxa metabólica, no entanto, não perdurou até a fase adulta. A autoras sugerem que, em algum ponto entre PND25-30 e PND70, o metabolismo dos ratos NR muda para um nível comparativamente mais alto em repouso que poderia compensar parcialmente o maior peso e massa gorda. Em combinação com uma ingestão de alimentos semelhante aos animais NN, o efeito sobre o metabolismo poderia atenuar o aumento de peso e gordura. Esse efeito foi comprovado ao observar que animais jovens de ninhada menor têm 2 vezes mais gordura epididimal e retroperitoneal que do que os controles e 1.3 vezes mais que os adultos. Apesar desta evidência que os ratos adultos que foram superalimentados na lactação sejam capazes de compensar o seu ganho de peso acelerado, aumentando o gasto de energia mais tarde, parece que esta "compensação" é insuficiente para reverter completamente o fenótipo sobrepeso na fase adulta; o que nos levou a inferir

que outros componentes do controle do balanço energético estariam envolvidos no perfil de sobrepeso dos animais NR.

Outra vertente apresentada pela literatura para esse ganho de peso independente da hiperfagia em animais NR é um prejuízo na termogênese adaptativa do tecido adiposo marrom (BAT), que atenuaria qualquer aumento compensatório potencial no gasto de energia nesta fase. O tecido adiposo marrom é responsável pela dissipação de energia como calor principalmente através de um desacoplamento mediado pela UCP-1 na fosforilação oxidativa, que seria um contribuinte significativo para o gasto energético global (CANNON; NEDERGAARD, 2004; NEDERGAARD et al., 2001). A expressão de UCP-1 no BAT e a termogênese adaptativa estão sob o controle rigoroso do sistema nervoso autônomo e de vários fatores hormonais. As evidências neuroanatômicas e fisiológicas mostram que o BAT é diretamente inervado pelo sistema nervoso simpático e a atividade desse sistema é aumentada pela exposição ao frio e pela ingestão alimentar. O neurotransmissor pós-ganglionar simpático é a noradrenalina (NE) que, após a ligação a receptores β -adrenérgicos (Adr- β), pode ativar a produção de calor no BAT ou aumentar cronicamente a capacidade termogênica através do recrutamento desse tecido, incluindo o aumento da proliferação e diferenciação de adipócitos marrons (BAMSHAD; SONG; BARTNESS, 1999; BACHMAN et al., 2002).

A deficiência da atividade da UCP-1 e da capacidade termogênica são características comuns para vários modelos genéticos obesos (JURGENS et al., 2006; MASAKI et al., 2000; TRAYHURN et al., 1982). No entanto, a superalimentação em uma idade precoce de vida pode resultar em dessensibilização ou reprogramação de vias reguladoras que regem a termogênese, o que pode contribuir para o prejuízo subsequente no gasto de energia na idade adulta (XIAO et al., 2007). Diversos estudos apontam atividades reduzida do BAT em animais NR, os quais apresentam expressão reduzida de UCP-1, lipase lipoprotéica (LPL – que faz a captação de ácidos graxos circulantes que servirão como combustível oxidativo), lipase hormônio sensível (HSL - que medeia a lipólise dos triglicerídeos estocados) e de enzimas lipogênicas que resulta em prejuízo no fornecimento de uma fonte de combustível para produção de calor. Além disso, os adipócitos marrons dos animais NR apresentam gotículas de

gordura em maior número e tamanho, que também são indicativos de uma redução da resposta termogênica nesse grupo (ALMEIDA et al., 2013; STEFANDINIS; SPENCER, 2012; XIAO et al., 2007). No presente estudo, a estimulação do BAT pelo agonista de receptor adrenérgico arterenol revelou uma sensibilidade diminuída, com menor elevação na temperatura corporal no animais NR, corroborando com os dados apresentados acima que revelam disfunção termogênica decorrente de uma possível reprogramação do circuito central que regula o fluxo simpático ocasionada pela superalimentação na lactação. Um prejuízo na função do BAT pode, portanto, resultar em maior armazenamento de energia e obesidade, mesmo na ausência de hiperfagia (HABBOU et al., 2013; LOWELL et al., 1993; XIAO et al., 2007).

Tendo em vista que os papéis da insulina e leptina na manutenção do fenótipo de sobrepeso em animais superalimentados na fase neonatal (NR) são amplamente conhecidos, como apresentado acima e pela literatura, o presente trabalho introduz o GLP-1 e a CCK-8 ao rol de hormônios com ação prejudicada pela manipulação do ambiente nutricional e como possíveis contribuintes para a permanência desse perfil.

O GLP-1 é um hormônio anorexígeno que regula a ingestão alimentar estimulando a secreção de insulina dependente de glicose (KREYMANN et al., 1989; WEIRC et al., 1989; THORENS, 1992), reduzindo glicemia através da inibição da secreção de glucagon (RITZEL et al., 1995), retardando o esvaziamento gástrico (SCHIRRA et al., 1996) e pela estimulação da proliferação e neogênese das células- β (STOFFERS et al., 2000; WANG, BRUBAKER, 2002), culminando na indução da saciedade. Os animais criados em ninhada pequena não responderam à administração periférica de uma dose baixa de GLP-1 (10 μ g/Kg) em nenhum dos tempos avaliados, apresentando ingestão alimentar semelhante aos animais que receberam salina fisiológica. Williams et al. (2011) sugeriram com seus estudos que a ingestão de uma dieta rica em gordura elevaria o nível no qual o receptor de GLP-1 seria estimulado para produzir um efeito anoréxico. Os dados desses autores, tomados em conjunto sugerem que o comprometimento na resposta anoréxica ao GLP-1 pode contribuir para o consumo excessivo e o aumento de peso quando os indivíduos consomem com frequência dietas ricas em gordura. Outros estudos tem demonstrado que os níveis GLP-1 no plasma estão reduzidos em casos de obesidade

e que a resistência à leptina (hormônio estimulador da liberação de GLP-1) pode estar ligada a secreção prejudicada desse hormônio (DUCA et al., 2013; RANGANATH et al., 1995; VERDICH et al., 2001). Anini e Brubaker (2003) demonstraram que roedores obesos tinham níveis basais de GLP-1 menores e que a secreção em resposta à glicose oral foi significativamente diminuída. Esses autores hipotetizaram que a leptina seria incapaz de manter a secreção basal de GLP-1 ou de potencializar a secreção induzida por alimentos nesses animais. Dessa maneira, a resistência à leptina, apresentada também pelos animais de ninhada reduzida estaria associada com a diminuição da secreção de GLP-1 que culminaria com menores níveis endógenos desse hormônio e supressão de sua ação anorexígena e de sua ação secundária sobre a elevação da insulina e consequente redução da glicemia.

A literatura ainda aponta que a supressão da ingestão de alimentos e do aumento da massa corporal mediada pelo GLP-1R, pelo menos no NTS, depende de um aumento da atividade da proteína cinase A (PKA) dependente de AMP cíclico (cAMP) e de uma inibição da atividade da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (HAYES et al., 2011). A sinalização de leptina é mediada, em parte, por essas mesmas vias intracelulares e a superalimentação neonatal induz resistência a esse hormônio. Assim, o perfil temporal da ação de GLP-1R pode ser afetado tanto pela resistência "inicial" da leptina central quanto pela *down-regulation* do receptor de GLP-1 no encéfalo (MUL et al. 2012). Ronveaux et al. (2012) sugeriram que o prejuízo da sinalização do GLP-1 pode ocorrer pois os GLP-1Rs mudam a localização celular de acordo com o perfil hormonal. Os níveis de expressão de proteína e a translocação dos GLP-1Rs em neurônios aferentes vagais são reduzidos quando há altos níveis de grelina e baixos de leptina (ou resistência à sua ação), que culmina com inibição da sinalização do GLP-1 e justificaria a expressão semelhante de c-Fos entre os grupos salina e GLP-1 de ninhada reduzida.

Outro meio pelo qual o GLP-1 atua no controle do metabolismo energético é por meio da modulação da termogênese no tecido adiposo marrom, elevando o gasto de energia e a temperatura corporal. A ativação central do GLP-1R eleva a capacidade termogênica do BAT aumentando a atividade das fibras simpáticas que inervam esse tecido e a expressão de enzimas que participam captação, mobilização e oxidação de

substratos para a termogênese (LPL, UCP-1, CPT1B entre outras), além de estimular a transdiferenciação de tecido adiposo branco em bege/marrom. Assim, a ativação desse sistema via GLP-1R pode ser um dos múltiplos mecanismos pelos quais, juntamente com a ingestão reduzida de alimentos e a diminuição da acumulação de lipídeos no WAT contribuiria para a manutenção do balanço energético (BEIROA et al., 2014; LOCKIE et al., 2012; LOPEZ, DIÉGUEZ, NOGUEIRAS, 2014; NOGUEIRAS et al., 2009;). Os dados desse estudo demonstraram um prejuízo da ação do GLP-1 sobre a temperatura corporal em ratos obesos, mas não em ratos magros, sugerindo um prejuízo na capacidade termogênica induzido pela superalimentação neonatal. Assim, respostas de secreção intestinal atenuada e sinalização de saciedade interrompida podem explicar a resistência à ação do GLP-1 contribuindo para o ganho de peso e prejuízos metabólicos observados nos animais de ninhada pequena desse estudo.

Os animais crescidos em ninhada menor também não apresentaram redução significativa na ingestão alimentar frente à administração de CCK-8, o que demonstra uma possível resistência à ação desse hormônio. Savastano e Covasa (2005) mostraram que animais obesos por ingestão crônica de uma dieta com *High-Fat* (HF) apresentavam diminuição na sensibilidade aos efeitos supressores da colecistocinina, em comparação com o consumo de uma dieta com baixo teor de gordura (LF – *low fat*). Swartz et al. (2010) demonstraram que filhotes de ratos alimentados com dieta rica em gordura apresentaram redução na sensibilidade à saciedade induzida por CCK. A ingestão do leite materno rico em triglicérideo durante o período neonatal e pós-natal está associada com alterações nas vias comportamentais, neuronais e metabólicas que perpetuam o consumo excessivo e a obesidade (LEVIN, 2010), de forma semelhante ao modelo induzido por dieta HF. Voits et al. (1996), ao trabalhar com o modelo de superalimentação neonatal por redução do número de filhotes por ninhada também demonstrou que uma dose mais baixa de CCK-8S (10µg/kg) foi capaz de reduzir a ingestão de alimentos durante as primeiras 2h em ratos de ninhada normal, mas não conseguiu influenciar a ingestão de alimentos provindos de ninhada pequena, tal qual foi demonstrado pelo presente estudo. No entanto, esses pesquisadores demonstram que os animais NR respondem à doses mais altas de

CCK exógena (40 ug/Kg), revelando uma perda na sensibilidade à esse hormônio. McLaughlin e Baile (1981) demonstraram, em camundongos geneticamente obesos em jejum, uma redução na sensibilidade ao efeito anorexigênico de uma dose baixa de CCK-8s (1 µg/kg), mas esses animais eram sensíveis a uma dose um pouco maior (2 µg/kg). As doses de 2 e 4 µg/kg de CCK-8S também não tiveram efeito na ingestão de alimentos em ratos obesos *Zucker* com 4-5 semanas de idade. No entanto uma dose mais elevada testada (8 µg/kg) diminui a ingestão de alimentos de ratos obesos e magros de forma semelhante (MCLAUGHLIN; BAILE, 1980).

A menor supressão do apetite induzido por CCK apresentado pelos animais NR ainda pode ser explicada como resultado do comprometimento do atraso no esvaziamento gástrico apresentado por este grupo. Um atraso no esvaziamento gástrico limita a taxa de absorção, reduzindo a taxa de entrega de nutrientes para o intestino delgado e está associada à supressão da ingestão de alimentos (MORAN, McMUGH, 1982; MORAN, McMUGH, 1988). McHugh (1979) sugeriram que a CCK pode atuar para reduzir a ingestão de alimentos indiretamente através de sua capacidade de produzir distensão gástrica, retardando a liberação de alimentos ingeridos do estômago. De Jonghe et al. (2006) mostraram, em ratos OLETF (deficientes em receptores CCK-1R), uma diminuição nas respostas de alimentação e ativação neuronal induzida por distensão gástrica, diminuição da mecanossensação gástrica e detecção de volume gástrico, em combinação com defeitos de saciedade, que podem ter facilitado o consumo excessivo apresentado por esses animais. Em vista do exposto, a resistência à ação da CCK exógena pode induzir a perda do sinal de saciedade induzida por esse hormônio que favorece o ganho de peso.

Para identificar os substratos neurais que podem estar envolvidos na mediação da saciedade da CCK periférica, foi avaliada a expressão de c-Fos em algumas estruturas encefálicas: AP, NTS, CeA, PVN, ARC, DMH e VMH, áreas que fazem a integração do sinal periférico da CCK e relacionam-se com o sistema de recompensa e de controle alimentar. A análise da imuno-histoquímica revelou um aumento no número de neurônios que expressam de proteína c-fos (indicador de ativação neuronal) em animais NN após a administração i.p de CCK em todas as áreas avaliadas, com exceção do VMH, o que não ocorreu em animais NR, indicando

prejuízo na sinalização central desse hormônio. Plagemann et al. (1998) hipotetizam que a perda de sensibilidade à ação anorexígena da CCK apresentada por animais NR é devido à resistência à insulina apresentada por esses animais que ocasionaria uma redução no número de neurônios hipotalâmicos CCK-8S-positivos, particularmente no núcleo paraventricular (PVN). Esse dado sugere uma inibição dos neurônios CCK hipotalâmicos por insulina elevada. A insulina é conhecida por atuar como um potente modulador de diferenciação neuronal e maturação (KESSLER, 1984). Hiperinsulinemia em ratos recém-nascidos, como observado no grupo NR, é acompanhada por níveis elevados de insulina hipotalâmica (HARDER et al., 1998). Portanto, uma redução do número de neurônios CCK-8S dentro do PVN poderia indicar perturbações específicas na diferenciação hipotalâmica e amadurecimento durante o desenvolvimento pós-natal. Supernutrição e hiperinsulinismo, respectivamente, durante o período perinatal crítico da organização hormonal do cérebro poderia ocasionar uma displasia permanente de núcleos hipotalâmicos que regulam o peso corporal e o metabolismo. Plagemann (2005) demonstrou ainda, que animais superalimentados precocemente não apresentaram diminuição ou supressão nos níveis de NPY sob estimulação de leptina e insulina, ao contrário, houve aumento tanto no número de neurônios NPY no ARC, bem como nas concentrações de NPY no PVN. A CCK circulante pode também atuar no núcleo arqueado aumentando o transporte de leptina (anoréxica) através da barreira hematoencefálica ou possivelmente atua diretamente em outras estruturas do cérebro, potencializando o sinal de saciedade. Se há resistência central à ação desse hormônio esse efeito é abolido (CANO et al., 2008). A obesidade em roedores (ratos *Otsuka Long Evans Tokushima* (OLETF)) também é associada à falta do CCK1R sugerindo um possível papel a longo prazo da atividade desse receptor no balanço energético. Esses ratos deficientes no receptor de CCK comem mais e tornam-se obesos, provavelmente devido à falta de saciedade e a um alto tônus do neuropéptido Y hipotalâmico (Bl et al., 2004). Foi observado ainda por Zippel et al. (2001) que os neurônios hipotalâmicos de ratos NN foram mais ativados e que os de ratos NR foram mais inibidos pela CCK, que os levaram a inferir, como nós, que os animais obesos apresentaram "má programação" neural duradoura da responsividade ao efeito anorexígeno da CCK que

pode ter contribuído para a persistência de distúrbios de peso em ratos supernutridos, resultante de influências nutricionais no cérebro em um período crítico de vida.

O presente estudo mostrou ainda, que o sobrepeso perinatal induz mudanças na resposta térmica à ação central da colescistocinina. Os animais NR apresentaram resistência não só à ação anoréxica, mas também à ação hipermetabólica e hipertérmica da CCK. Estudos de Yoshimatsu et al. (1992), demonstraram que a administração central de CCK em ratos está associada a um aumento na taxa de disparo do sistema nervoso simpático, que inerva o tecido adiposo marrom (BAT). Esses nervos simpáticos do BAT são responsáveis pela ativação deste tecido que aumenta a produção de calor e conseqüentemente a taxa metabólica induzindo hipertermia e vasoconstrição. Esses dados revelam que a função anorexigênica e hipermetabólica da CCK tem papel fundamental no equilíbrio energético, contribuindo na adaptação metabólica à ingestão calórica, para manter a homeostase. Assim, uma menor atividade da CCK culminaria com menor ativação do BAT e menor gasto energético, favorecendo o ganho de peso. Uma má organização adquirida, afetando particularmente neurônios peptidérgicos específicos, tais como aqueles que expressam CCK, podem persistir durante a vida e contribuir, pelo menos em parte, para o sobrepeso em animais NR.

Mhalhal et al. (2017) afirmam em seus estudos que o GLP-1 e a CCK compartilham áreas intestinais comuns que contêm sítios de ação e alta concentração de receptores desses peptídeos, bem como uma rica rede de neurônios entéricos e aferentes vagais. Essas áreas são ativadas por esses hormônios e comunicam-se com as áreas cerebrais que relacionam-se com o controle da ingestão alimentar, como AP, DMH e NTS aumentando a imunorreatividade c-Fos nesses neurônios. Esses autores demonstraram que a administração de uma dose baixa de GLP-1 reduziu o peso corporal em ratos machos obesos por dieta hiperlipídica e que a CCK-8 aumentou esta redução quando os dois peptídeos foram infundidos perto de seus locais gastrointestinais de ações (artérias mesentérica cranial e celíaca). Esse estudo demonstra uma correlação entre os hormônios estudados nesse trabalho, o que nos permite inferir que o prejuízo na ação de um deles contribui para o comprometimento da ação do outro.

Assim, os dados aqui apresentados reforçam que o excesso de alimentos no período pós-natal precoce, induzido por pequenas ninhadas pode resultar em anormalidades a longo prazo na homeostase do peso corporal e no metabolismo lipídico e glicêmico. Este estudo forneceu novas evidências que relacionam o sobrepeso apresentado pelos animais NR às alterações na sensibilidade às ações da CCK e do GLP-1, tanto na supressão do apetite, quanto na elevação do gasto energético via termogênese adaptativa promovida pelo tecido adiposo marrom, que se estabelece em decorrência de um rearranjo morfofuncional de neurônios responsáveis pela homeostase energética. Estes dados fornecem base que tornam o período pós-natal imediato um grande interferente no controle metabólico e neural da ingestão e do peso corporal e que a superalimentação precoce exerce efeitos duradouros capazes de reprogramar esses mecanismos reguladores.

Sendo assim, faz-se necessário assegurar uma alimentação adequada, principalmente nos dois primeiros anos de vida, uma vez que esse período é janela de oportunidade crítica para assegurar o crescimento e o desenvolvimento adequados de crianças (WORLD BANK, 2006). Estudos demonstraram que a amamentação apropriada pode prevenir 13% das mortes que ocorrem em crianças com menos de 5 anos de idade no mundo, enquanto as práticas de alimentação complementares adequadas resultariam em uma redução adicional de 6% em menores de cinco anos (JONES et al., 2003). Os alimentos complementares precisam ser nutricionalmente adequados e seguros para satisfazer as necessidades de energia e nutrientes da criança. No entanto, a alimentação complementar é muitas vezes repleta de problemas, como o uso de alimentos muito diluídos, redução na frequência ou na quantidade da ingestão ou substituindo o leite materno em qualidade inferior. Tanto a alimentação como as práticas de alimentação influenciam a qualidade da alimentação complementar ofertada. Assim, as mães e as famílias precisam de apoio para praticar uma boa alimentação complementar (PAHO/WHO, 2002). Logo, os profissionais da saúde, com destaque para os pediatras, enfermeiros e nutricionistas, desempenham um papel importante nas suas práticas como defensores do aleitamento materno e de uma nutrição adequada na primeira infância.

Por fim, consideramos que a alteração na disponibilidade e/ou qualidade da alimentação e do aleitamento materno merecem atenção e investigações mais detalhadas, tendo em vista a vulnerabilidade desse período às influências ambientais, sociais e nutricionais que podem predispor ao aumento de tecido adiposo, peso, dislipidemias, bem como às alterações metabólicas e endócrinas que podem perdurar até a fase adulta. Estes estudos poderão auxiliar na compreensão de mecanismos que possam atenuar essas alterações e abrir novos caminhos profiláticos e/ou terapêuticos na prevenção e no combate da obesidade e de suas consequências.

8 CONCLUSÃO

A superalimentação neonatal induzida pela redução do tamanho da ninhada foi capaz de favorecer o ganho de peso corporal na prole, o acúmulo de tecido adiposo visceral branco, elevar os níveis de lipídeos circulantes, além de prejudicar a homeostase glicêmica e a termogênese facultativa no tecido adiposo na fase adulta. A superalimentação neonatal também prejudicou a ação anorexigênica/termogênica e de estimulação da secreção de insulina do *glucagon-like peptide-1* e os efeitos anorexigênico/termogênico e de retardo do esvaziamento gástrico da colecistocinina-8, reduzindo a capacidade de atuar sobre núcleos centrais na ativação de neurônios responsáveis pelo controle energético. A resistência à ação desses hormônios pode contribuir para a manutenção do perfil de sobrepeso dos animais de ninhada pequena. Assim, evitar a superalimentação durante a vida pós-natal precoce parece ser um dos meios eficazes de impedir a programação pós-natal adversa que culmina com problemas metabólicos e sobrepeso a longo prazo.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, C. R. et al. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 1044, p. 127–131, 2005.
- AHIMA, R. S. et al. Leptin regulation of neuroendocrine systems. **Front. Neuroendocrinol.**, Orlando, v. 21, n. 3, p. 263- 307, 2000.
- AHIMA, R.; OSEI, S. Y. Leptin and appetite control in lipodystrophy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, New York, v. 89, n. 9, p. 4254- 4257, 2004.
- ALFARADHI, M. Z.; OZANNE, S. E. Developmental Programming in Response to Maternal Overnutrition. **Front. Genet.**, Lousanne, v. 2, n. 27, p. 1–13, 2011.
- ALMEIDA, D. L. et al. Early Overfeed-Induced Obesity Leads to Brown Adipose Tissue Hypoactivity in Rats. **Cell Physiol. Biochem.**, Basel, v. 32, p. 1621-1630, 2013.
- ALVES, J. G. B. et al. **Pediatria**: Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP). 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- ANANDHAKRISHNAN, A.; KORBONITS, M. Glucagon-like peptide 1 in the pathophysiology and pharmacotherapy of clinical obesity. **World J. Diabetes**, Pleasanton, v. 7, n. 20, p. 572-598, 2016.
- ANINI, Y.; BRUBAKER, P. L. Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. **Diabetes**, Alexandria, v. 52, n. 2, p. 252-259, 2003.
- BACHMAN, E. S. et al. β AR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. **Science**, Washington, v. 297, p. 843–845, 2002.
- BADMAN, M. K.; FLIER, J. S. The Gut and Energy Balance: Visceral Allies in the Obesity Wars. **Science**, Washington, v. 307, n. 1909, 2005.
- BALLAZ, S. The unappreciated roles of the cholecystinin receptor CCK(1) in brain functioning. **Rev. Neurosci.**, Berlin, v. 28, n. 6, p. 573-585, 2017.
- BAMSHAD, M.; SONG, C. K.; BARTNESS, T. J. CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 276, p. R1569–R1578, 1999.
- BARANOWSKA, B. et al. Disturbed release of gastrointestinal peptides in anorexia nervosa and in obesity. **Diabetes Obes. Metab.**, Oxford, v. 2. n. 2, p. 99-103, 2000.
- BARKER, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, London, v. 311, p. 171–174, 1995.

BARRERA, J. G. et al. GLP-1 and energy balance: an integrated model of short-term and long-term control. **Nat. Rev. Endocrinol.**, London, v. 7, p. 507–516, 2011.

BASSETT, D. R.; CRAIG, B. W. Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. **J. Appl. Physiol.**, Bethesda, v. 64, p. 1249–1256, 1988.

BECSKEI, C. et al. Lesion of the lateral parabrachial nucleus attenuates the anorectic effect of peripheral amylin and CCK. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 1162, n. 76–84, 2007.

BEI, F. et al. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. **Lipids Health Dis.**, London, v. 14, p. 96, 2015.

BEIROA, D. et al. GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. **Diabetes**, Alexandria, v. 63, p. 3346–3358, 2014.

BENOIT, S. C. et al. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. **J. Neurosci.**, Washington, v. 22, n. 20, p. 9048–9052, 2002.

BI, S. et al. Differential body weight and feeding response to high fat diets in rats and mice lacking cholecystokinin 1 receptor. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 283, p. R55–63, 2007.

BÍBLIA SAGRADA. A.T. **Isaías**. Nova edição rev. e ampl. 7ª imp. São Paulo: Paulus, 2011. 2206p.

BÍBLIA SAGRADA. N.T. **João**. Nova edição rev. e ampl. 7ª imp. São Paulo: Paulus, 2011. 2206p.

BOURET, S. G. Organizational actions of metabolic hormones. **Front. Neuroendocrinol.**, Orlando, n. 34, p. 18 – 26, 2013.

BOURET, S. G.; SIMERLY, R. B. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. **Clin. Genet.**, Copenhagen, n. 70, p. 295 – 301, 2006.

BOURET, S. G.; SIMERLY, R. B. Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. **Endocrinology**, New York, n. 145, p. 2621 – 2626, 2004.

BRITO, N. A.; BRITO, M. N.; BARTNESS, T. J. Differential sympathetic drive to adipose tissues after food deprivation, cold exposure or glucoprivation. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Bethesda, v. 294, p. R1445–R1452, 2008.

BRUNTON, P. J. et al. Sex-specific effects of prenatal stress on glucose homeostasis and peripheral metabolism in rats. **J. Endocrinol.**, Bristol, v. 217, p. 161–173, 2013.

CAMILLERI, M. Integrated upper gastrointestinal response to food intake. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 131, p. 640–658, 2006.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 84, p. 277–359, 2004.

CANO, V. et al. A cholecystinin-1 receptor agonist (CCK-8) mediates increased permeability of brain barriers to leptin. **Br. J. Pharmacol.**, London, v. 154. N. 5, p. 1009–1015, 2008.

CARROLL, L.; VOISEY, J.; VAN DAAL, A. Mouse models of obesity. **Clin. Dermatol.**, New York, v. 22, p. 345–349, 2004.

CARVALHO, A. L. O. et al. Early life overnutrition induced by litter size manipulation decreases social play behavior in adolescent male rats. **Int. J. Devl. Neurosci.**, Oxford, v. 53, p. 75–82, 2016.

CHEN, H. et al. Maternal and Postnatal Overnutrition Differentially Impact Appetite Regulators and Fuel Metabolism. **Endocrinology**, New York, v. 149, n. 11, p. 5348–5356, 2008.

CLEARY, M. P.; VASSELLI, JR.; GREENWOOD, M. R. Development of obesity in Zucker obese (fa/fa) rat in absence of hyperphagia. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 238, p. E284-E292, 1980.

COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Arch. Med. Sci.**, Poznan, v. 9, n. 2, p. 191-200, 2013.

COLLDEN, G. et al. Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. **Mol. Metab.**, München, v. 4, n. 1, p. 15-24, 2014.

COMMINS, S. P. et al. Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin. **Endocrinology**, New York, v. 140, n. 1, p. 292-300, 1999.

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

CONCEIÇÃO, E.P.S. et al. Neonatal overfeeding causes higher adrenal catecholamine content and basal secretion and liver dysfunction in adult rats. **Eur. J. Nutr.**, Darmstadt, v. 52, n. 4, p. 1393-1404, 2013.

CUNHA, A. C. et al. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion—the role of GLUT-2. **J. Nutr. Biochem.**, Stoneham, v. 20, p. 435–442, 2009.

DAILEY, M. J.; MORAN, T. H. Glucagon-like peptide 1 and appetite. **Trends Endocrinol. Metab.**, New York, v. 24, n. 2, p. 85-91, 2013.

- DAVIDOWA, H.; HEIDEL, E.; PLAGEMANN, A. Differential involvement of dopamine D1 and D2 receptors and inhibition by dopamine of hypothalamic VMN neurons in early postnatally overfed juvenile rats. **Nutr. Neurosci.**, Abingdon, v. 5, p. 27–36, 2002.
- DAVIDOWA, H.; LI, Y.; PLAGEMANN, A. Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons of normal and postnatally overnourished rats differ in their responses to melanin-concentrating hormone. **Regul. Pept.**, Amsterdam, n. 108, p. 103 – 111, 2002.
- DAVIDOWA, H.; ZISKA, T.; PLAGEMANN, A. Arcuate neurons of overweight rats differ in their responses to amylin from controls. **Neuroreport.**, London, n. 15, p. 2801 – 2805, 2004.
- DAVIDOWA, H.; LI, Y.; PLAGEMANN, A. The main effect of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on hypothalamic neuronal activity depends on the nutritional state of rats. **Neuro Endocrinol. Lett.**, Stockholm, v. 26, p. 29–34, 2005.
- DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Action of prolactin, prolactin releasing peptide and orexins on hypothalamic neurons of adult, early postnatally overfed rats. **Neuro Endocrinol. Lett.**, Stockholm, v. 26, p. 453–458, 2005.
- DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Hypothalamic neurons of postnatally overfed, overweight rats respond differentially to corticotrophin-releasing hormones. **Neurosci. Lett.**, Limerick, v. 371, p. 64–68, 2004.
- DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. **Neuroreport.**, London, v. 18, p. 521–524, 2007.
- DAVIDOWA, H.; ZISKA, T.; PLAGEMANN, A. GABAA receptor antagonists prevent abnormalities in leptin, insulin and amylin actions on paraventricular hypothalamic neurons of overweight rats. **Eur. J. Neurosci.**, Oxford, v. 23, p. 1248–1254, 2006.
- De JONGHE, B. C.; HAJNAL, A.; COVASA, M. Decreased gastric mechanodetection, but preserved gastric emptying, in CCK-1 receptor-deficient OLETF rats. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, Bethesda, v. 291, p. G640–G649, 2006.
- DE MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; PASSOS, M. C. F. Neonatal Programming of Neuroimmunomodulation – Role of Adipocytokines and Neuropeptides. **Neuroimmunomodulation**, Basel, v. 15, n. 3, p. 176-188, 2008.
- DE MOURA, E.G.; PASSOS, M.C. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. **Biosci. Reports**, London, v. 25, p. 251–269, 2005.
- DE MOURA, R. F. et al. Metabolic syndrome signs in wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v. 101, n. 8, p. 1178-1184, 2009.
- DUCA, F. A. et al. Decreased intestinal nutrient response in diet-induced obese rats: role of gut peptides and nutrient receptors. **Int. J. Obes.**, London, v. 37, p. 375–381, 2013.

EBBELING, C. B.; PAWLAK, D. B.; LUDWIG, D. S. Childhood obesity: public health crisis, common sense cure. **Lancet.**, London, v. 360, n. 9331, p. 473–482, 2002.

ENES-MARQUES, S.; GIUSTI-PAIVA, A. Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. **J Physiol Sci**, Tokyo, 2018.

FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Genetic factors in human obesity. **Obes. Rev.**, Oxford, n. 8, p. 37 - 40, 2007.

FAROOQI, I. S. et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 110, n. 8, p. 1093-103, 2002.

FERNANDEZ, C.M. et al. The expression of rat resistin isoforms is differentially regulated in visceral adipose tissues: effects of aging and food restriction. **Metabolism.**, Philadelphia, v. 58, n. 2, p. 204-211, 2009.

FIOROTTO, M. L. et al. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 260, n. 6 Pt 2, p. R1104-1113, 1991.

FISBERG, M. **Atualização e obesidade na infância e adolescência**. São Paulo; Atheneu, 2004.

FLIER, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, Cambridge, v. 116, p. 337 – 350, 2004.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. The Adipose Tissue as a Regulatory Center of the Metabolism. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FREEDMAN, D. S. et al. The Relation of Overweight to Cardiovascular Risk Factors Among Children and Adolescents: The Bogalusa Heart Study. **Pediatrics**, Elk Grove Village Il, v. 103, n. 6, p. 1175-1182, 1999.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, Washington Dc, v. 18, p. 499-502, 1972.

FRIEDMAN, J. M. A war on obesity, not the obese. **Science**, New York, v. 299, p. 856 – 858, 2003.

FUNAKOSHI, A. et al. Gene structure of human cholecystokinin (CCK) type-A receptor: body fat content is related to CCK type-A receptor gene promoter polymorphism. **FEBS Lett.**, West Sussex, v. 466, n. 2-3, p. 264-266, 2000.

- GALJAARD, S.; DEVLIEGER, R.; VAN ASSCHE, F. A. Fetal growth and developmental programming. **J. Perinat. Med.**, Berlin, n. 41, p. 101 – 105, 2013.
- GIUSTI-PAIVA, A. et al. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Eur. J. Physiol.**, Berlin, v. 447, p. 175–180, 2003.
- GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Science**, Washington, DC, v. 305, p. 1733–1736, 2004.
- GROVE, K. L.; SMITH, M. S. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. **Physiol. Behav.**, New York, v. 79, p. 47–63, 2003.
- GUERRERO-ROMERO, F. et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 95, p. 3347–3351, 2010.
- HABBOU, A. et al. Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. **Biochimie.**, Paris, v. 94, p. 117–124, 2012.
- HABBOU, A. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. **J Nutr**, Rockville, v. 143, p. 553–562, 2013.
- HAHN, P. Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents. **J. Nutr.**, Rockville, v. 114, n. 7, p. 1231-1234, 1984.
- HALAAS, J. L. et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, New York, v. 269, p. 546–549, 1995.
- HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, Berlin, n. 35, p. 595 – 601, 1992.
- HARDER, T. et al. Fruhpostnatale Alterationen von Insulin und katecholaminergem System im Hypothalamus bei Nachkommen estations diabetischer Rattenmütter, **Diab. Stoffw**, v. 7 (Suppl. 1) p. 120, 1998.
- HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutr. Res. Rev.**, Cambridge, v. 23, n. 2, p. 270-299, 2010.
- HARMS, P. G.; OJEDA, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J Appl Physiol.**, Bethesda, v. 36, p. 391-392, 1974.
- HAYES, M. R. et al. Intracellular signals mediating the food intake suppressive effects of hindbrain glucagon-like-peptide-1 receptor activation. **Cell Metab.**, Cambridge, v. 13, n. 3, p. 320–330, 2011.

HEIDEL, E.; PLAGEMANN, A.; DAVIDOWA, H. Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. **Neuroreport.**, London, v. 10, p. 1827–1831, 1999.

HEPPNER, K. M.; PEREZ-TILVE, D. GLP-1 based therapeutics: simultaneously combating T2DM and obesity. **Front. Neurosci.**, Lausanne, v. 9, p. 92, 2015.

HERRMANN C. et al. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. **Digestion**, Basel, v. 56, p. 117–126, 1995.

HILL, D. R. et al. Autoradiographic localization and biochemical characterization of peripheral type CCK receptors in rat CNS using highly selective non-peptide CCK agonists. **J. Neurosci.**, Washington, DC, v. 7, p. 2967-2976, 1987.

HOWARD, J. K.; FLIER, J. S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. **Trends Endocrinol. Metab.**, New York, v. 17, n. 9, p. 365-371, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil/IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro, 2011.

JEQUIER, E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 967, p. 379-388, 2002.

JOHNSON, P.R. et al. Effect of early nutrition on adipose cellularity and pancreatic insulin release in the Zucker rat. **J. Nutr.**, Rockville, v. 103, p. 738-743, 1973.

JONES, G. et al. How many child deaths can we prevent this year? **Lancet**, London, n. 362, p. 65-71, 2003.

JURGENS, H.S. et al. Hyperphagia, lower body temperature, and reduced running wheel activity precede development of morbid obesity in New Zealand obese mice. **Physiol. Genomics**, Bethesda, v. 25, p. 234–241, 2006.

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

KAUNG, H. L. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. **Dev. Dyn.**, New York, v. 200, p. 163–75, 1994.

KENNEDY, G. C. The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. **J. Endocrinol.**, Bristol, v. 16, p. 9–17, 1957.

KESSLER, J. A. et al. C terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 34, p. 154-60, 1981.

KREYMANN, B. et al. Glucagon-like peptide-1 7–36: a physiological incretin in man. **Lancet**, London, v. 2, p. 1300–1304, 1987.

LACLAUSTRA, M.; CORELLA, D.; ORDOVAS, J. M. Metabolic syndrome pathophysiology: The role of adipose tissue. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, Amsterdam, v. 17, p. 125–139, 2007.

LAKSHMAN, R.; ELKS, C. E.; ONG, K. K. Childhood obesity. **Circulation**, Hagerstown, v. 126, n. 14, p. 1770–1779, 2012.

LEVIN, B. E. Interaction of perinatal and pre-pubertal factors with genetic predisposition in the development of neural pathways involved in the regulation of energy homeostasis. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1350, p. 10-17, 2010.

LI, Y.; PLAGEMANN, A.; DAVIDOWA, H. Increased inhibition by agouti-related peptide of ventromedial hypothalamic neurons in rats overweight due to early postnatal overfeeding. **Neurosci. Lett.**, Limerick, v. 330, p. 33–36, 2002.

LITTLE, T. J.; HOROWITZ, M.; FEINLE-BISSET, C. Role of cholecystikinin in appetite control and body weight regulation. **Obes. Rev.**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 297-306, 2005.

LIU, H. W. et al. Adult-onset obesity induced by early life overnutrition could be reversed by moderate caloric restriction. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, Bethesda v. 305, p. E785–E794, 2013.

LOCKIE, S. H. et al. Direct Control of Brown Adipose Tissue Thermogenesis by Central Nervous System Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Signaling. **Diabetes**, Alexandria, v. 61, p. 2753-2762, 2012.

LÓPEZ, M. et al. Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. **Int. J. Obes.**, London, v. 31, p. 371–377, 2007.

LÓPEZ, M. et al. A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. **Diabetologia**, Berlin, n. 48, p. 140 – 148, 2005.

LÓPEZ, M.; DIÉGUEZ, C.; NOGUEIRAS, R. Hypothalamic GLP-1: the control of BAT thermogenesis and browning of white fat. **Adipocyte**, Philadelphia, v. 4, n.2, p. 141-145, 2014.

LOWELL B. B. et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. **Nature**, London, v. 366, p. 740–742, 1993.

LUCAS, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. **J. Nutr.**, Rockville, n. 128, p. 401S – 406S, 1998.

- MACINTOSH, C. G. et al. Effect of Exogenous Cholecystinin (CCK)-8 on Food Intake and Plasma CCK, Leptin, and Insulin Concentrations in Older and Young Adults: Evidence for Increased CCK Activity as a Cause of the Anorexia of Aging. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 86, n. 12, p. 5830–5837, 2001.
- MADSBAD, S. The role of glucagon-like peptide-1 impairment in obesity and potential therapeutic implications. **Diabetes Obes. Metab.**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 9-21, 2014.
- MANCO, M.; CALVANI, M.; MINGRONE, G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. **Diabetes Obes. Metab.**, Oxford, v. 6, p. 402-413, 2004.
- MASAKI, T. et al. Impaired response of UCP family to cold exposure in diabetic (db/db) mice. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Bethesda, v. 279, p. R1305–R1309, 2000.
- MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell functions from fasting plasma glucose and insulin concentrations im man. **Diabetologia**, Berlin, v. 28, p. 412-419, 1985.
- MCHUGH, P. R. Effect of the control of feeding. **Johns Hopkins Med. J.**, Baltimore, v. 144, p. 147-155, 1979.
- McLAUGHLIN, C. L.; BAILE, C. A. Feeding response of weanling Zucker obese rats to cholecystinin and bombesin. **Physiol. Behav.**, New York, v. 25, p. 341-346, 1980.
- McLAUGHLIN, C. L.; BAILE, C. A. Obese mice and the satiety effects of cholecystinin, bombesin and pancreatic polypeptide. **Physiol. Behav.**, New York, v. 26, p. 433-437, 1981.
- McMILLEN, I. C.; ADAM, C. L.; MUHLHAUSLER, B. S. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. **J. Physiol.**, Oxford, v. 565, p. 9-17, 2005.
- McMILLEN, I. C.; ROBINSON, J. S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. **Physiol. Rev.**, Bethesda, n. 85, p. 571 – 633, 2005.
- MELLO, A. D. M. et al. Prevalência de Sobrepeso e Obesidade em Crianças de seis a dez anos de Escolas Municipais de Área Urbana. **Revista Paulista de Pediatria**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 48-54, 2010.
- MERCHENTHALER, I.; LANE, M.; SHUGHRUE, P. Distribution of pre-proglucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. **J. Comp. Neurol.**, Hoboken, v. 403, p. 261-280, 1999.
- MESSINA, G. et al. Role of Autonomic Nervous System and Orexinergic System on Adipose Tissue. **Front. Physiol.**, Lausanne, v. 8, n. 137, 2017.
- MHALHAL, T. R. Exogenous glucagon-like peptide-1 reduces body weight and

cholecystokinin-8 enhances this reduction in diet-induced obese male rats. **Physiol. Behav.**, New York, n. 179, p. 191–199, 2017.

MILLER, L. J.; DESAI, A. J. Metabolic Actions of the Type 1 Cholecystokinin Receptor: Its Potential as a Therapeutic Target. **Trends Endocrinol. Metab.**, New York, v. 27, n. 9, p. 609-619, 2016.

MILLER, L. J.; LYBRAND, T. P. Molecular basis of agonist binding to the type A cholecystokinin receptor. **Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 91, p. 282–285, 2002.

MOEHLECKE, M. et al. Determinants of body weight regulation in humans. **Arch. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 152-162, 2016.

MORAN T.H. Cholecystokinin and satiety: current perspectives. **Nutrition**, Burbank, v. 16, p. 858–865, 2000.

MORAN, T. H. et al. Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptor. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 274, p. R618- R625, 1998.

MOREIRA, A. S. et al. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, Amsterdam, v. 19, p. 805-810, 2009.

MORRISON, J. A. et al. Metabolic syndrome in childhood predicts adult metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus 25 to 30 years later. **J. Pediatr.**, St. Louis, v. 152, p. 201–206, 2008.

MOURA, R.F. **Exercício físico na prevenção e no tratamento da Síndrome metabólica: um modelo experimental com ratos.** 2010. 151F. Tese (Doutorado em Ciências da Motricidade) - Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2010.

MOZES, S. et al. Obesity and changes of alkaline phosphatase activity in the small intestine of 40 - and 80-day-old rats subjected to early postnatal overfeeding or monosodium glutamate. **Physiol. Res.**, Praha, v. 53, n. 2, p. 177-186, 2004.

MUL, J.D. High-fat diet changes the temporal profile of GLP-1 receptor-mediated hypophagia in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Bethesda, v. 305, p. R68-R77, 2013.

NASCIMENTO, A. F. et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in Wistar rats. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 6, p. 968-974, 2008.

NÄSLUND, E.; HELLSTRÖM, P. M. Appetite signaling: From gut peptides and enteric nerves to brain. **Physiol. Behav.**, New York, v. 92, p. 256–262, 2007.

NEDERGAARD, J. et al. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1504, p. 82–106, 2001.

NOGUEIRAS, R. et al. Direct control of peripheral lipid deposition by CNS GLP-1 receptor signaling is mediated by the sympathetic nervous system and blunted in diet-induced obesity. **J. Neurosci.**, Washington, v. 29, p. 5916-5925, 2009.

OBICI, S. et al. Identification of a biochemical link between energy intake and energy expenditure. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.109, p.1599-1605, 2002.

OJHA, S. et al. Suboptimal maternal nutrition affects offspring health in adult life. **Early Hum. Dev.**, Limerick, v. 89, n.11, p. 909-913, 2013.

ORLANDI, L. et al. Sickness behavior is accentuated in rats with metabolic disorders induced by a fructose diet. **Journal of Neuroimmunol.**, Amsterdam v. 289, p. 75-83, 2015.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat brain, in stereotaxic coordinates.** 7 ed. San Diego: Academic Press, 2007.

PAHO/WHO. **Guiding principles for complementary feeding of the breastfed child.** Washington DC: Pan American Health Organization/World Health Organization; 2002.

PLAGEMANN, A. et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. **J. Perinat. Med.**, Berlin, v. 38, p. 393- 400, 2010.

PLAGEMANN, A. et al. Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 818, p. 160–163, 1999a.

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

PLAGEMANN, A. et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. **J. Neuroendocrinol.**, Malden, v.11, p. 541–546, 1999c.

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 Res.**, Amsterdam, v. 836, p. 146–155, 1999b.

PLAGEMANN, A. et al. Reduction of cholecystinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. **Neurosci. Lett.**, Limerick, v. 258, p. 13–16, 1998.

PLAGEMANN, A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. **Horm. Res.**, Basel, v. 65, Suppl 3, p. 83–89, 2006a.

PLAGEMANN, A. Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. **Physiol. Behav.**, New York, v. 86, n. 5, p. 661-668, 2005a.

PLAGEMANN, A. Perinatal programming. **J. Perinat. Med.**, Berlin, v.34, p. 256–257, 2006b.

PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. **J. Nutr.**, Rockville, n. 130, p.2582 – 2589, 2000.

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 Res.**, Amsterdam, n. 836, p. 146 – 155, 1999d.

PORTE, D. JR.; WOODS, S. C. Regulation of food intake and body weight in insulin. **Diabetologia**, Berlin, v. 20, Suppl. 274-280, 1981.

POSSAMAI, F. et al. Influence of enrichment on behavioral and neurogenic effects of antidepressants in Wistar rats submitted to repeated forced swim test. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, Oxford, v. 58 p. 15–21, 2015.

PRAGER, E. M. Et al. The importance of reporting housing and husbandry in rat research. **Behav. Neurosci.**, Lausanne, v. 5, p.38, 2011.

PREIS, S. R. et al. Neck circumference as a novel measure of cardiometabolic risk: The Framingham Heart Study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 95, n. 8, p. 3701-3710, 2010.

PRINZ, P.; STENGEL, A. Control of Food Intake by Gastrointestinal Peptides: Mechanisms of Action and Possible Modulation in the Treatment of Obesity. **J. Neurogastroenterol. Motil.**, Seoul, v. 23, n. 2, p.180-196, 2017.

PUNJABI, M. et al. Peripheral glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and satiation. **Physiol. Behav.**, New York, v. 105, n. 1, p. 71-76, 2011.

RAJIA, S.; CHEN, H.; MORRIS, M. J. Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet. **J. Neuroendocrinol.**, Malden, v. 22, p. 905-914, 2010.

RANGANATH, L. R. et al. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? **Gut**, London, v. 38, p.916– 919, 1996.

REIDELBERGER, R. et al. Effects of leptin replacement alone and with exendin-4 on food intake and weight regain in weight reduced diet-induced obese rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 302, p. E1576–E1585, 2012.

REILLY, J. J. et al. Health consequences of obesity. **Arch. Dis. Child.**, London, v. 88, p. 9, p. 748–752, 2003.

REMMERS, F.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. **Endocr. Rev.**, New York, v. 32, n. 2, p. 272-311, 2011.

RITZEL, R. et al. Pharmacokinetic, insulinotropic, and glucagonostatic properties of GLP-1 [7–36 amide] after subcutaneous injection in healthy volunteers: dose-response-relationships. **Diabetologia**, Berlin, v. 38, p. 720–725, 1995.

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

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

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

RORATO, R. et al. Cannabinoid CB1 receptor restrains accentuated activity of hypothalamic corticotropin-releasing factor and brainstem tyrosine hydroxylase neurons in endotoxemia-induced hypophagia in rats. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 63, p. 154-160, 2012.

RONVEAUX, C.C; TOMÉ, D.; RAYBOULD, H.E. Glucagon-Like Peptide 1 Interacts with Ghrelin and Leptin to Regulate Glucose Metabolism and Food Intake through Vagal Afferent Neuron Signaling. **J Nutr.**, Springfield, v. 145, p.672–680, 2015.

SAHU, A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. **Front. Neuroendocrinol.**, Orlando, v. 24, n. 4, p. 225-253, 2003.

SANDOVAL, D. A.; D'ALESSIO, D. A. Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 95, n. 2, p. 513-548, 2015.

SAPER, C. B.; CHOU, T. C.; ELMQUIST, J. K. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. **Neuron.**, Cambridge, v. 36, n. 2, p. 199-211, 2002.

SAVASTANO, D. M.; COVASA, M. Adaptation to a High-Fat Diet Leads to Hyperphagia and Diminished Sensitivity to Cholecystikinin in Rats. **J. Nutr.**, Rockville, v. 135, p. 1953–1959, 2005.

SAYEGH, A. I. The role of cholecystikinin receptors in the short-term control of food intake. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, Amsterdam, v. 114, p. 277-316, 2013.

- SCARPIGNATO, C. et al. Effect of dexloxiglumide and spiroglumide, two new CCK-receptor antagonists, on gastric emptying and secretion in the rat: evaluation of their receptor selectivity in vivo. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 411-419, 1996.
- SCHIRRA, J. et al. Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 97, p. 92–103, 1996.
- SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, London, v. 404, n. 6778, p. 661-671, 2000.
- SCHWARTZ, M. W. et al. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. **Endocr. Rev.**, New York, v. 13, n. 3, p. 387-414, 1992.
- SCOTT, K. A.; MORAN, T. The GLP-1 Agonist Exendin-4 Reduces Food Intake in Nonhuman Primates Through Changes in Meal Size. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Bethesda, v. 293, n. 3, p. R983-R987, 2007.
- SHANKAR, K. et al. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Bethesda, v. 294, n. 2, p. 28-38, 2008.
- SHIN, A. C.; ZHENG, H.; BERTHOUD, H. R. An expanded view of energy homeostasis: neural integration of metabolic, cognitive, and emotional drives to eat. **Physiol. Behav.**, New York, v. 97, p. 572–580, 2009.
- SICHERI, R.; SIQUEIRA, K. S.; MOURA, A. S. Obesity and abdominal fatness associated with undernutrition early in life in a survey in Rio de Janeiro. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, Hampshire, v. 24, p. 614-618, 2000.
- SILVA, V. C.; GIUSTI-PAIVA, A., Sickness behavior is delayed in hypothyroid mice. **Brain, Behav. Immun.**, Amsterdam, v. 45, p. 109-117, 2015.
- SMITH, M. M.; MINSON, C. T. Obesity and adipokines: effects on sympathetic overactivity. **J. Physiol.**, London, v. 590, p. 1787–1801, 2012.
- SPENCER, S. J.; TILBROOK, A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v. 34, p. 1133-1143, 2009.
- STECULORUM, S. M.; BOURET, S. G. Developmental effects of ghrelin. **Peptides**, New York, n. 32, p. 2362 – 2366, 2011.
- STEFANIDIS, A.; SPENCER, S. J. Effects of Neonatal Overfeeding on Juvenile and Adult Feeding and Energy Expenditure in the Rat. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e52130, 2012.
- STEINER, A. A.; COLOMBARI, E.; BRANCO, L. G. S. Carbon monoxide as a novel mediator of the febrile response in the central nervous system. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 277, p. R499-R507, 1999.

STEINERT, R. E. et al. Oral administration of glucagon-like peptide 1 or peptide YY 3-36 affects food intake in healthy male subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 92, p. 810–817, 2010.

STOFFERS, D. A. et al. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. **Diabetes**, Alexandria, v. 49, p. 741–748, 2000.

STOLAR, M. Metabolic syndrome: Controversial but useful. **Cleve Clin. J. Med.**, Cleveland, v. 74, p. 199–202, 205–208, 2007.

STURM, K. et al. Appetite, food intake, and plasma concentrations of cholecystokinin, ghrelin, and other gastrointestinal hormones in undernourished older women and well-nourished young and older women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, New York, v. 88, n. 8, p. 3747-3755, 2003.

SUZUKI, K. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. **Endocr. J.**, Tokyo, v. 57, n. 5, p. 359-372, 2010.

SWARTZ, T. D.; SAVASTANO, D. M.; COVASA, M. Reduced Sensitivity to Cholecystokinin in Male Rats Fed a High-Fat Diet Is Reversible. **J. Nutr.**, Rockville, v. 140, p. 1698–1703, 2010.

TASSITANO, R. M. et al. Prevalência e fatores associados ao sobrepeso e à obesidade em adolescentes, estudantes de escolas de Ensino Médio de Pernambuco, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n.12, p. 2639-2652, 2009.

TEODORO, L. C. et al. P2 purinergic receptor antagonists disrupt maternal behavior in lactating rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Tarrytown, n. 158, p. 1–6, 2017.

THORENS, B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the glucagon-like peptide 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 89, p. 8641–8645, 1992.

TRAYHURN, P. et al. Effects of overfeeding on energy balance and brown fat thermogenesis in obese (ob/ob) mice. **Nature**, London, v. 295, p. 323–325, 1982.

TWIG, G. et al. Body-mass index in 2.3 million adolescents and cardiovascular death in adulthood. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 374, n. 25, p. 2430–2440, 2016.

VAN BAAK, M. A. Meal-induced activation of the sympathetic nervous system and its cardiovascular and thermogenic effects in man. **Physiol. Behav.**, New York, v. 94, p. 178–186, 2008.

VELKOSKA, E.; COLE, T. J.; MORRIS, M. J. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 288, p. e1236–1243, 2005.

VERDICH, C. et al. The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety: effect of obesity and weight reduction. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, London, v. 25, p. 1206–1214, 2001.

VILLARROYA, F.; VIDAL-PUIG, A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. **Cell Metab.**, Cambridge, v. 17, p. 638–643, 2013.

VOITS, M. et al. Obesity induced by unspecific early postnatal overfeeding in male and female rats: hypophagic effect of CCK-8S. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, Berlin, v. 354, p. 374-378, 1996.

WANG, Q.; BRUBAKER, P. L. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. **Diabetologia**, Berlin, v. 45, p. 1263–1273, 2002.

WEIRC G. C. et al. Glucagon-like peptide I (7–37) actions on endocrine pancreas. **Diabetes**, Alexandria, v. 38, p. 338–342, 1989.

WILLIAMS, D. L. et al. Maintenance on a high-fat diet impairs the anorexic response to glucagon-like-peptide-1 receptor activation. **Physiol. Behav.**, New York, v. 103, p. 557–564, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Report of the commission on ending childhood obesity**. Geneva, Switzerland, 2016.

WORLD BANK. **Repositioning nutrition as central to development: a strategy for large scale action**. Washington DC: The World Bank; 2006.

WOZNIAK, S. E. et al. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 54, p. 1847-1856, 2009.

XIAO, X. Q. et al. Excess Weight Gain during the Early Postnatal Period Is Associated with Permanent Reprogramming of Brown Adipose Tissue Adaptive Thermogenesis. **Endocrinology**, New York, v. 148, n. 9, p. 4150–4159, 2007.

YOSHIMATSU, H.; EGAWA, M.; BRAY, G. A. Effects of cholecystokinin on sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue. **Brain. Res.**, Amsterdam, v. 597, p. 298–303, 1992.

ZHANG, L. et al. Accumulation of intestinal tissue 3-deoxyglucosone attenuated GLP-1 secretion and its insulinotropic effect in rats. **Diabetol. Metab. Syndr.**, London, v. 8, p. 78, 2016.

ZIPPEL, U. et al. Action of CCK and 5-HT on Lateral Hypothalamic Neurons Depends on Early Postnatal Nutrition. **Nutr. Neurosci.**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 143-152, 2001.

ANEXO

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas/MG - CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 - Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 16 de julho de 2014.

Prof. Alexandre Giusti Paiva

Prezado Professor,

O projeto sob sua coordenação, registro nº 568/2014, intitulado "Efeito da redução de ninhada sobre a ingestão alimentar, termogênese e função cardiovascular da prole adulta" está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA – Unifal-MG