



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS METABÓLICOS, COMPORTAMENTAIS E
CARDIOVASCULARES DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR DURANTE A
PUBERDADE EM RATOS ADULTOS OBESOS E NÃO OBESOS**

LETÍCIA CHAVAGLIA CAVALET

GOIÂNIA-GO
2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Leticia Chavaglia Cavalet

Título do trabalho: Efeitos metabólicos, comportamentais e cardiovasculares da restrição alimentar durante a puberdade em ratos adultos obesos e não obesos.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO¹**

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Leticia Chavaglia Cavalet

Ciente e de acordo:



Rodrigo Mello Gomes

Data: 15 / 04 / 2019

¹Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

LETÍCIA CHAVAGLIA CAVALET

**EFEITOS METABÓLICOS, COMPORTAMENTAIS E
CARDIOVASCULARES DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR DURANTE A
PUBERDADE EM RATOS ADULTOS OBESOS E NÃO OBESOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes

GOIÂNIA-GO

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Chavaglia Cavalet, Leticia
Efeitos metabólicos, comportamentais e cardiovasculares da
restrição alimentar durante a puberdade em ratos adultos obesos e não
obesos. [manuscrito] / Leticia Chavaglia Cavalet. - 2019.
44, f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes; co-orientador Dr.
Gustavo Rodrigues Pedrino.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2019.
Bibliografia. Anexos.
Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras.

1. Programação cardiometabólica. 2. Redução de ninhada. 3. Restrição
alimentar. 4. Obesidade. 5. Comportamento. I. Mello Gomes, Rodrigo,
orient. II. Título.

CDU 612



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 495

1
2 Aos dois dias do mês de abril do ano de dois mil e dezenove, às catorze horas ,
3 no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas II da Universidade Federal de
4 Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Rodrigo
5 Mello Gomes, Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio e Profa. Dra. Flávia
6 Campos Corgosinho para, em sessão pública presidida pelo primeiro
7 examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada
8 "Efeitos metabólicos, comportamentais e cardiovasculares da restrição
9 alimentar durante a puberdade em ratos adultos obesos e não obesos", em
10 nível de mestrado, área de concentração em Farmacologia e Fisiologia, de
11 autoria de **Letícia Chavaglia Cavalet**, discente do Programa de Pós-
12 Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão
13 foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da
14 banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação que em cerca
15 de 24 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a
16 apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o
17 sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à
18 avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1491
19 de 2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que
20 regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a
21 dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este
22 requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela
23 Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da
24 entrega da versão definitiva da dissertação na Secretaria do programa, com as
25 devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a
26 contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

27 16 horas e 55 minutos, encerrou-se a sessão de defesa de
28 dissertação e, para constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em
29 Administração da Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Ciências
30 Biológicas da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após
31 lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três
32 vias de igual teor.

33
34
35
36 **Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes**
37 **Presidente da Banca**
38 **Universidade Federal de Goiás**

39
40
41 **Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio**
42 **Universidade Federal de Goiás**

43
44
45 **Profa. Dra. Flávia Campos Corgosinho**
46 **Universidade Federal de Goiás**

UFG

LETÍCIA CHAVAGLIA CAVALET

**EFEITOS METABÓLICOS, COMPORTAMENTAIS E
CARDIOVASCULARES DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR DURANTE A
PUBERDADE EM RATOS ADULTOS OBESOS E NÃO OBESOS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes
Universidade Federal de Goiás

Profa. Flávia Campos Corgosinho
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio
Universidade Federal de Goiás

Aprovada em: ____/____/____

Imagination will often carry us to worlds that
never were. But without it we go nowhere.

-Carl Sagan

Agradecimentos

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela formação profissional e pessoal excepcionais que me proporcionaram desde a graduação. Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEG pelo apoio financeiro indispensável para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes, que me mostrou o caminho, transmitindo o seu entusiasmo pela ciência para nós alunos e fazendo com que uma tarefa tão difícil parecesse fácil. Obrigada pela oportunidade de desenvolver este projeto, por sua paciência em ensinar e por seus conselhos.

Agradeço também a minha família, meu pai, minha mãe, meus avós, minha madrinha, meus irmãos, tios, tias e primos. Sem a fundação que eu tive em casa, o apoio e o carinho de vocês, eu nunca teria sido capaz de chegar aqui. Devo tudo a vocês e ao exemplo e orientação que vocês sempre me deram.

A meus amigos que me adotaram em Goiânia: Andressa, Lana, Anna, Larissa, Kássia, Millena, Anália, João Pedro, Mada, Gustavo, Lobó, Ice, Jota, por todas as furadas que a gente se meteu e todas as vezes que vocês salvaram a minha vida.

Aos amigos que fiz durante a minha estadia no LabFem e no CPNFC que tanto me auxiliaram com a realização deste projeto, me explicando conceitos difíceis, me apoiando durante os momentos de experimentação e sofrimento, e me acompanhando em várias aventuras, em especial ao João, Aryanne, Thais, Laila, Lara, Nathália, Melissa, Florência, Paulo, Larissa Córdova, Gabriel, Diógenes, Lucas, Alba, Raquel, Órion e Larissa.

Por fim, agradeço a todos os meus predecessores no campo de metabolismo e fisiologia, que fizeram com que esta linha de questionamento fosse sequer possível.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo geral.....	7
2.2 Objetivo específico.....	7
3. METODOLOGIA	8
3.1 Animais e delineamento experimental.....	8
3.2 Avaliação do comportamento tipo-ansiedade	9
3.3 Avaliação da atividade locomotora e exploratória.....	9
3.4 Avaliação do comportamento tipo-depressão.....	10
3.5 Canulação da artéria femoral e veia cava inferior.....	10
3.6 Registro de pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC).....	10
3.7 Eutanásia e coleta de tecidos.....	11
3.8 Análises histológicas.....	11
3.9 Western Blot.....	12
3.10 Análise estatística.....	13
4.RESULTADOS	15
4.1 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre o peso corporal.....	15
4.2 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre o consumo alimentar.....	17
4.3 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre a gordura corporal.....	18
4.4 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre o comportamento de ansiedade a partir do teste de labirinto em cruz.....	19
4.5 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre o comportamento de ansiedade e locomoção/exploração a partir do teste de campo aberto o.....	21

4.6 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre o comportamento de depressão a partir do teste nado forçado.....	23
4.7 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre a pressão arterial.....	24
4.8 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre a morfologia cardíaca.....	26
4.9 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre a expressão proteica dos receptores do SRA e da MAPK / ERK.....	28
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÃO.....	34
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
8. ANEXO.....	35
REFERÊNCIAS.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SL	Small litter
NL	Normal litter
SLFR	Small litter + Food restriction
NLFR	Normal litter + Food restriction
SLC	Small litter + Controle
NLC	Normal litter + Controle
OF	Open field
EPM	Elevated plus maze
FS	Forced swimming
CA	Campo aberto
LCE	Labirinto em cruz elevado
NF	Nado forçado
oGTT	Teste de tolerância a glicose
ipITT	Teste de tolerância a insulina
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
cm	Centímetro
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
g	Gramas
bpm	Batimentos por minutos
mg	Miligramas
min	Minutos
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PAS	Pressão arterial sistólica

ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
RAS	Sistema renina-angiotensina
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
AT1	<i>Angiotensin II type 1 receptor</i>
AT2	<i>Angiotensin II type 2 receptor</i>
Mas-R	<i>Mas-receptor</i>
µm	Micrometros

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Visão global do RAS.....	3
Figura 02. Linha do tempo experimental demonstrando períodos de tratamento dos grupos.....	9
Figura 03. Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar no peso corporal.....	16
Figura 04. Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar na ingestão alimentar.....	17
Figura 05. Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar no peso dos depósitos de gordura.....	18
Figura 06. Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar nos parâmetros comportamentais utilizando labirinto em cruz.....	20
Figura 07. Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar nos parâmetros comportamentais utilizando campo aberto.....	22
Figura 08. Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar nos parâmetros comportamentais de depressão utilizando nado forçado.....	23
Figura 09. Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar nos parâmetros cardiovasculares.....	25
Figura 10. Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar sob a morfologia cardiovascular.....	27
Figura 11. Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar sob a expressão proteica dos receptores AT1, AT2 e MAS.....	28
Figura 12. Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar sob a expressão proteica de ERK e p-ERK.....	29

RESUMO

Perturbações ambientais e nutricionais durante o período perinatal causam disfunções metabólicas na prole através de alterações epigenéticas afetando negativamente a saúde em geral. Portanto, a restrição alimentar possui o potencial de afetar o organismo através dos mesmos mecanismos, e seus efeitos em animais metabolicamente programados para obesidade precisam ser elucidados. O objetivo deste trabalho foi determinar se a restrição alimentar impactaria parâmetros comportamentais e cardiovasculares de animais obesos e não obesos e o envolvimento do sistema renina angiotensina (SRA) e da MAPK / ERK no coração desses animais. Três dias após o nascimento, ratas Wistar foram separadas em grupos *small litter* (SL, 3 filhotes) ou *normal litter* (NL, 9 filhotes). Posteriormente uma leva de animais de ambas as proles foram submetidos a restrição alimentar (50%) enquanto outra leva permaneceu com livre acesso a alimento durante o período da puberdade (dos 30 aos 60 dias). Aos 120 dias, foi realizado registro acordado para a avaliação de parâmetros cardiovasculares, testes de campo aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE) e nado forçado (NF) para avaliação de parâmetros comportamentais. Adicionalmente, o peso corporal e ingestão alimentar foram monitorados durante todo o período experimental. Por fim, os animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta de tecidos, para a subsequente realização de western blot e histologia. Os animais SL e SLR apresentaram sobrepeso, desenvolvendo o fenótipo de obesidade, visível através de depósitos de gorduras aumentados ($p<0.05$). Diferenças na pressão arterial sistólica e diastólica também foram observadas, quando comparando animais SL com os demais grupos ($p<0.05$). Adicionalmente, as proles SL e SLR demonstraram uma tendência a comportamento tipo-ansiedade durante os testes comportamentais, considerando o tempo de imobilidade durante o teste CA ($p<0.05$), e o número de entradas nos braços abertos durante o LCE ($p<0.05$). Também foi constatada a presença de remodelamento cardíaco nos animais NLR e SLR, a partir da presença de fibrose perivascular e intersticial ($p<0.05$), assim como alterações na expressão dos receptores AT1, AT2 e das proteínas ERK e p-ERK ($p<0.05$). O presente estudo demonstrou que supernutrição precoce causou obesidade, comportamento tipo-ansiedade e aumento da pressão sanguínea. Adicionalmente, os animais submetidos a restrição alimentar não demonstraram melhoras nos testes comportamentais, contudo os animais não obesos submetidos a dieta demonstraram similarmente comportamento tipo-ansiedade, e pela primeira vez foi demonstrado que restrição alimentar tem a capacidade de causar remodelamento cardíaco, sugerindo que a restrição alimentar severa durante a adolescência é capaz de desencadear programação metabólica, afetando negativamente estes animais durante a vida adulta.

Palavra-chave: Programação cardiometabólica; Redução de ninhada; Restrição alimentar; Obesidade; Cardiovascular; Comportamento.

ABSTRACT

Environmental and nutritional disorders during the perinatal period cause metabolic dysfunction in the progeny and impairs health through epigenetic programming, which is observable in the small litter (SL) experimental model. Therefore, severe caloric restriction has the potential of affecting several organic systems through the same epigenetic mechanisms, and its effects need elucidation. The objective of this work was to determine whether the food restriction would impact behavioral and cardiovascular parameters in obese and non-obese animals, and the implications to the renin-angiotensin system (RAS) as well as MAPK/ERK in these animals' hearts. Three days after delivery, female Wistar rats were separated in small litter (SL, 3 pups) and normal litter (NL, 9 pups) groups, their offspring in turn were subjected to food restriction (50%), while another group had free access to chow during the puberty period (from 30 to 60 days). These animals were then subjected to non-anaesthetized recording for the evaluation of cardiovascular parameters, open field (OF), elevated plus maze (EPM) and forced swimming (FS) tests for behavioural analysis. In addition, their body weight and food intake were monitored throughout the experimental period. Finally, the animals were anesthetized, euthanized and had their organs harvested, weighted and preserved for subsequent histological and western blot analysis. SL and SLR offspring were overweight ($p < 0.05$), developing the obese phenotype, observable through increased deposits of white adipose tissue ($p < 0.05$). Differences in mean arterial pressure were also observed, when comparing small litter control animals with the rest of the groups ($p < 0.05$). In addition, SL and SLR offspring showed a tendency for anxiety-like behaviour during the OF test, considering immobility time ($p < 0.05$), and EPM tests considering the number of entries into the open arms ($p < 0.05$). Cardiac remodelling in the NLR and SLR groups was also observed, through the presence of interstitial and perivascular fibrosis ($p < 0.05$), as well as higher expressions of the receptors AT1 and AT2, and of the proteins ERK and p-ERK ($p < 0.05$). The present study shows that early overnutrition caused obesity, anxiety-like behaviours and increases to blood pressure. Also, the animals which underwent food restriction showed no improvement in the behavioural tests, however the non-obese animals subjected to the diet showed similar impairments in behaviour, and for the first time it was shown that severe food restriction caused cardiac remodelling, suggesting that severe food restriction during puberty is capable of causing metabolic programming, negatively impacting these animals later in adult life.

Keywords: Cardiometabolic programming; Litter size reduction; Food restriction; Obesity; Cardiovascular; Behavior.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que existam atualmente mais de 1,9 bilhões de adultos, e aproximadamente 41 milhões de crianças com menos de cinco anos apresentando sobrepeso em todo o mundo (1). Esse cenário representa um problema significativo de saúde pública devido ao potencial aumentado de morbidade e mortalidade associadas às doenças que correspondem a um quadro de síndrome metabólica, como também por seus crescentes números na população (2).

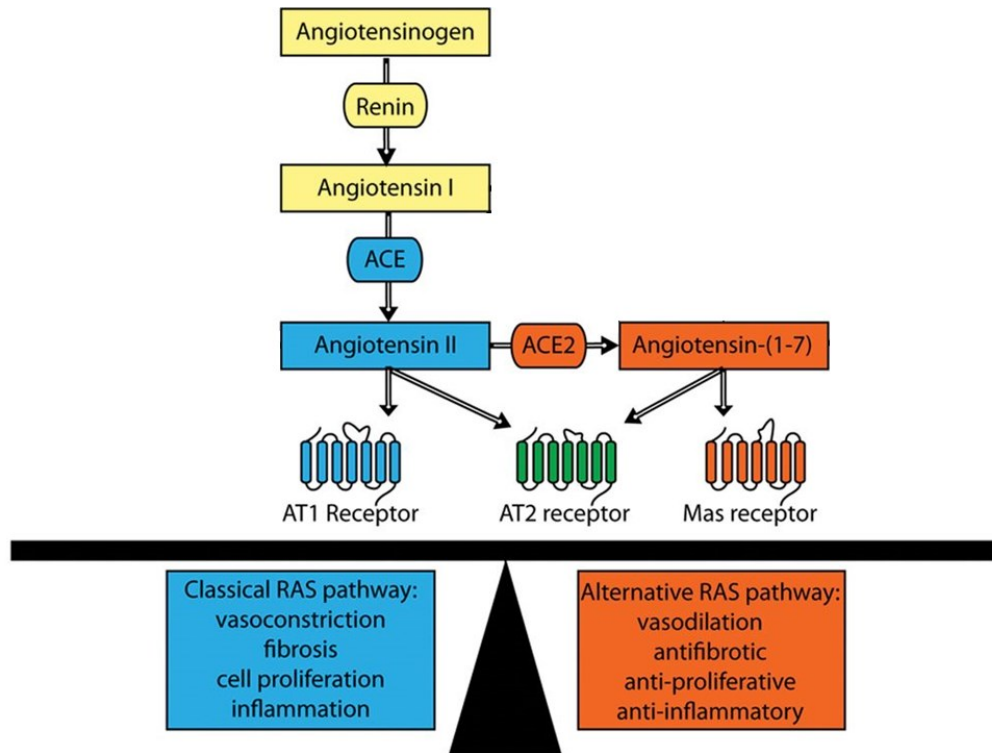
Estas alarmantes estatísticas se correlacionam com as recentes mudanças comportamentais da população mundial, vendo-se uma tendência maior ao sedentarismo e consumo de dietas hipercalóricas (3). Estas mudanças se devem a combinação do aumento na disponibilidade de alimentos palatáveis com altas quantidades de gorduras e açúcares em sua composição e da transição para estilos de vida menos ativos nas últimas décadas (4). Esta tendência foi evidenciada por um estudo feito pela Sociedade Brasileira de Cardiologia em 2005, estimando que aproximadamente 80% dos brasileiros são classificados como sedentários (5), que corroborada com os mais recentes relatórios da OMS indicando que mudanças culturais e o aumento da urbanização levam a estilos de vida mais sedentários mundialmente (1). A combinação destes fatores comportamentais levam a um balanço energético positivo, onde consome-se mais calorias do que necessário para a realização das atividades diárias, e o excedente calórico é armazenado na forma de triacilgliceróis no tecido adiposo, promovendo aumento na massa de tecido adiposo e ganho de peso (6).

Porém, a obesidade também está relacionada a mudanças no sistema mesocorticolímbico e ao consumo de alimentos altamente calóricos, através de uma cascata de sinalização dopaminérgica que gera sensação de prazer quando estimulados pelo consumo de açúcar ou gorduras. Este quadro leva ao desenvolvimento de compulsão alimentar o que contribui para a dificuldade de se reverter o desequilíbrio energético gerado por uma dieta não balanceada, quando associada a fatores comportamentais (7). Tais mudanças no comportamento alimentar da população são fatores de risco, fortemente associados ao aumento na prevalência de distúrbios metabólicos tais como a resistência à insulina, potencialmente evoluindo para um quadro de diabetes tipo 2, dislipidemia, problemas

cardiovasculares, hipertensão, esteatose hepática não alcoólica, entre outras morbidades, caracterizando um quadro de síndrome metabólica (8).

O quadro de obesidade é caracterizado primariamente por proliferação e hipertrofia das células adiposas, de forma que a massa adiposa do indivíduo aumenta excessivamente (9). Os desbalanços na produção de substâncias pró-inflamatórias decorridas da obesidade, tais como TNF- α e IL-6 (10), evidencia que a obesidade promove um ambiente inflamatório, condutivo ao desenvolvimento de diversas doenças, e entre elas destacam-se distúrbios cardiovasculares tais como a aterosclerose, que são fatores de risco conhecidos para aumento de pressão sanguínea, que por sua vez leva a danos celulares cumulativos e progressivos ao miocárdio (11).

Doenças cardiovasculares emergem a partir de mudanças na homeostase, que causam desbalanços em múltiplos mecanismos responsáveis por regular atividade cardiovascular. Fatores como inflamação, anormalidades no metabolismo de lipídeos, resistência à insulina, disfunção endotelial, desbalanços das adipocinas, ativação do inflamassoma, alterações a microbiota intestinal, e enfraquecimento dos mecanismos de autofagia já foram sugeridos como a conexão entre doenças cardiovasculares prevalentes em pacientes obesos tais como a aterosclerose e a patologia metabólica da obesidade (12). Contudo, um dos mecanismos humorais mais proeminentes de regulação da atividade cardiovascular é o sistema renina-angiotensina, sendo que a angiotensina II atua nos cardiomiócitos, através da ativação dos receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1) presentes no tecido cardíaco, estimulando cascatas pró-inflamatórias, que por vez estimulam crescimento e proliferação celular, culminando no desenvolvimento de fibrose intersticial, afetando a função contrátil (13). Também é importante notar que a cascata de mediadores que leva ao remodelamento patológico do miocárdio apenas começa com a angiotensina II, e leva a liberação da cinase *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), que causa hipertrofia e fibrose dos cardiomiócitos (14).



Fonte: Update on new aspects of the renin–angiotensin system in liver disease: clinical implications and new therapeutic options

Figura 01: Visão global do sistema RAS. Os efeitos do RAS são determinados pelo balanço entre o eixo “clássico” mediado por angiotensina II, demonstrado em azul, que é pró-inflamatório e pró-fibrótico, e o eixo “alternativo” demonstrado em laranja mediado por angiotensina 1-7, que tem ação anti-inflamatória e anti-fibrótica. Ambas angiotensina 1-7 e angiotensina II podem também estimular o receptor AT2, demonstrado em verde, cujos efeitos são frequentemente análogos aos mediados por MasR (15).

Além de doenças cardiovasculares, tem sido demonstrado uma forte associação entre desordens de humor e inflamação, responsável em grande parte por manter a homeostase do organismo, porém potencialmente deletério até mesmo em condições fisiológicas (16). Estudos demonstram que a indução de um estado inflamatório através da administração de endotoxina (lipopolissacarídeos) e da citocina inflamatória IL-1 é capaz de induzir um comportamento análogo ao de depressão, incluindo letargia, interesse diminuído em exploração e aumento do tempo de sono em animais (17). Em humanos, foi demonstrado que a utilização de interferons com o intuito de tratar hepatite C, dependendo da dose administrada, levou de 25 a 80% dos pacientes a apresentarem um episódio depressivo, reportadamente associados a níveis elevados de citocinas e não de cortisol (18–20).

Adicionalmente, já foi demonstrado que obesidade induzida por supernutrição durante a vida pós-natal está relacionada a diversos efeitos deletérios, entre eles disfunções mitocondriais que contribuem para a diminuição das vias da fosforilação oxidativa, resultando em uma produção anormal de espécies reativas de oxigênio (ROS) (21). Contudo, a relação entre o stress oxidativo e a obesidade é uma de duas vias, foi proposto por Youn *et al.* 2014 que o stress oxidativo pode não ser somente uma consequência da obesidade, mas também um fator responsável por gerar predisposição ao seu desenvolvimento através da produção vascular de ROS (22).

Tem se observado que distúrbios nutricionais durante fases críticas do desenvolvimento tais como a gestação e a lactação possuem potencial de levar a sérias consequências metabólicas durante a vida adulta (23), tais como obesidade e níveis elevados de insulina e leptina circulantes (24). O período neonatal, devido a plasticidade genômica, é crítico para a determinação de características fenotípicas na idade adulta, o que orienta a premissa do conceito de programação cardiometabólica (25). Um modelo utilizado no estudo da programação cardiometabólica é a redução de ninhada (*small litter*, SL), onde a redução no número de filhotes da prole durante o início da lactação leva a supernutrição durante este período suscetível a mudanças epigenéticas, impactando expressão gênica e influenciando as chances do desenvolvimento de doenças metabólicas (26). Adicionalmente, o modelo aparenta causar disfunções na sinalização de insulina no miocárdio (27) e hipertrofia cardíaca acompanhada por redução de densidade nos vasos do miocárdio em ratos jovens (25). Animais SL apresentam fenótipo obeso na vida adulta, cujo as concentrações elevadas dos hormônios leptina e insulina podem atuar como fatores de *imprinting* gênico, alterando padrões de expressão proteica por vias epigenéticas (28). Trata-se de um bom modelo para o estudo de síndrome metabólica, pois animais submetidos a redução de ninhada desenvolvem hiperfagia, obesidade, hipertensão, dislipidemia, assim como resistência hipotalâmica à leptina e à insulina quando adultos (29). Esta associação entre estresse induzido em fases chave do desenvolvimento e as subsequentes consequências metabólicas é denominada programação metabólica, remetendo a um conceito conhecido como Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), e este fenômeno está intimamente ligado a mudanças epigenéticas que comprometem o organismo como um todo (30). Developmental Origins of Health and Disease é um termo cunhado recentemente, se referindo ao

conceito inicialmente chamado de “Fetal origins of Adult Disease” desenvolvido nos anos 90 pelo time dos doutores Hales e Barker (31).

Outros fatores podem levar à estas mudanças epigenéticas deletérias, apontadamente quando há obesidade maternal induzida por introdução de uma dieta hiperlipídica (HFD). Trabalhos demonstraram que os danos metabólicos causados durante a gravidez persistiram nos filhotes e não puderam ser revertidos na vida adulta por meio de uma dieta balanceada, porém eram exacerbados com a reexposição a HFD (32). Estes animais metabolicamente programados consomem mais açúcar quando estão sob estresse (33), adicionalmente foi demonstrada a preferência por HFD pelos animais SL quando adultos (34).

Nos últimos anos, vem emergindo novas evidências apontando para uma rede interconectada de áreas no sistema límbico que utilizam neurotransmissão opioide para responder a estímulos causados por alimentos altamente palatáveis e reforçar o comportamento de busca por estes alimentos, configurando um comportamento hedônico no controle da ingestão alimentar (35,36). Estes *hotspots* hedônicos já foram identificados em áreas como o núcleo acumbens (NAc) e o pallidum ventral (35). Também é notável a relação entre comportamentos alimentares aberrantes e mudanças no sistema de recompensa dopaminérgico, sabendo-se que hormônios como a insulina e a leptina regulam o sistema mesocorticolímbico inibindo a produção de dopamina nos neurônios do NAc (37). Portanto, as mudanças comportamentais observadas podem ser relacionadas a alterações no sistema dopaminérgico do cérebro, e estas alterações são observadas no modelo SL (38). Também já foi demonstrado que a exposição a situações de estresse durante o período de puberdade em ratos induz alterações comportamentais de construção de independência, exacerbando comportamentos comuns ao fim da puberdade, tais como aumento da curiosidade, busca de sensações prazerosas e exposição a risco (39).

A neurogênese e o estabelecimento de novas conexões neuronais ocorrem durante a gravidez e a lactação, e certos hormônios e nutrientes com função de promover a saciedade possuem a capacidade de os modular, tais como os neurotransmissores orexigênicos neuropeptídeo Y (NPY) e anorexigênicos como o *pro-opiomelanocortin* (POMC) que podem se tornar responsáveis pela preferência por

dietas mais gordurosas quando modulados através da exposição da mãe a dieta hiperlipídica, levando a alterações danosas no comportamento alimentar (40).

Um estudo mostrou que ratos sofrem modulação metabólica induzida por distúrbios nutricionais que ocorrem durante a puberdade. Nos animais em questão, as mudanças epigenéticas foram induzidas por meio da administração de uma dieta hipoproteica, o que causou acúmulo de tecido adiposo em conjunto com disfunção nas ilhotas pancreáticas, e mudanças no funcionamento do sistema nervoso autônomo (41). Também já foi observado que a puberdade é um período criticamente suscetível para o desenvolvimento de desordens alimentares, tais como a bulimia e a anorexia (42), também foi observado que dietas restritivas em outras fases de desenvolvimento epigeneticamente plásticas, tais como os primeiros dias de vida são capazes de causar programação metabólica (43). A hipótese hormética da restrição calórica aponta que ela representa um fator estressor, responsável por ativar respostas de sobrevivência, aumentando defesas e auto reparo celular o que em determinadas intensidades potencialmente possui a capacidade de reparar danos oxidativos em células, porém em outras potencialmente possui efeitos deletérios. Um estudo sugere que a restrição calórica de 40 a 45% pode aumentar a longevidade, enquanto maiores intensidades reduzem a expectativa de vida (44).

Por outro lado, redução alimentar pode ser definida como a redução da ingestão de alimentos quando comparado a ingestão *ad libitum*. Foi observado que dietas hipocalóricas (20 a 30%) possuem o potencial de prevenir danos ao miocárdio através de redução a pressão arterial, níveis de lipídeos circulantes, processos inflamatórios e oxidativos (45). Pode-se observar, portanto, que um melhor entendimento dos mecanismos da síndrome metabólica pode evitar a incidência de doenças cardiometabólicas, tais como, hipertensão, esteatose hepática não alcoólica, diabetes tipo 2, entre outras doenças. Nesse sentido, é fundamental o desenvolvimento de pesquisas que possam contribuir para elucidar os mecanismos fisiopatológicos da síndrome metabólica causada pela programação durante fases cruciais do desenvolvimento, tais como a lactação e a puberdade. Portanto o presente trabalho visa contribuir para o entendimento das patologias associadas a obesidade, do potencial programador da restrição alimentar severa durante a puberdade, assim como a diferença na resposta de animais obesos e não obesos ao mesmo fator estressor representado pela restrição alimentar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos metabólicos, comportamentais e cardiovasculares da restrição alimentar durante a puberdade em ratos obesos e não obesos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar em ratos submetidos a restrição calórico/alimentar durante a puberdade:

- O comportamento alimentar e a evolução do peso corporal;
- A adiposidade visceral e subcutânea;
- Os parâmetros comportamentais de ansiedade e depressão;
- A pressão arterial pulsátil e frequência cardíaca;
- A morfologia cardíaca através de técnicas histológicas;
- A expressão proteica dos receptores AT1, AT2 e MAS no tecido cardíaco através de Western blot;
- A expressão proteica da ERK total e ERK fosforilada no tecido cardíaco através de Western blot.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e delineamento experimental

As condutas laboratoriais foram realizadas de acordo com as normas estabelecidas pelo CONCEA/SBCAL e previamente aprovadas pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA-UFG, protocolo nº 052/17).

Ratos Wistar com 60-70 dias de idade (200 – 250 gramas) originados do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás foram acomodados no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, Goiás. Durante todo o período experimental os animais permaneceram em caixas de polipropileno (45 cm / 30 cm / 15 cm) sob condições controladas de luminosidade [12 h claro-escuro (06:00-18:00 h)] e temperatura ($22,0 \pm 2^\circ \text{C}$). Após uma semana de adaptação os animais foram relocados em caixas para cruzamento na proporção de duas fêmeas para um macho. Constatada a prenhes, pela presença de espermatozoides em lâminas de esfregaço da secreção vaginal, as fêmeas foram postas em caixas individuais.

Três dias após o nascimento, os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle, onde as ninhadas foram padronizadas para 9 filhotes por mãe e grupo ninhada reduzida, onde as ninhadas serão padronizadas para 3 filhotes por mãe, e estes números foram mantidos durante todo o período de lactação. Após o desmame foi padronizado o número de 3 animais por caixa para todos grupos e mantidos desta forma durante todo período experimental.

Aos 30 dias de idade os animais foram subdivididos em outros dois grupos experimentais: animais dos grupos controle e ninhada reduzida com acesso livre a ração padrão (*Nuvilab*®, Colombo, Paraná, Brasil), constituindo os grupos controle + dieta livre (NLC) e ninhada reduzida + dieta livre (SLC), respectivamente. Outro grupo de animais foram subdivididos em outros dois grupos onde os animais foram submetidos a restrição alimentar de 50% da ingestão alimentar de seus grupos correspondentes, constituindo os grupos controle + restrição alimentar (NLFR) e ninhada reduzida + restrição alimentar (SLFR), respectivamente. A restrição alimentar foi realizada dos 30 aos 60 dias de idade, e após este período os animais retornaram

ao consumo de alimentos e água *ad libidum*. Os filhotes foram mantidos sob as mesmas condições de alojamento descrita para seus pais e durante todo o período experimental, com acesso livre a água. A ingestão alimentar e o peso corporal foram avaliados diariamente. O número de animais (n) foi de 20 a 24 animais por cada grupo experimental e para cada protocolo experimental foram usados animais de ninhadas diferentes, para evitar o efeito ninhada. Grupos distintos de animais foram utilizados para a realização dos experimentos de registro acordado e para os testes comportamentais e coleta de amostras.

CEUA – UFG (protocolo nº 052/2017)

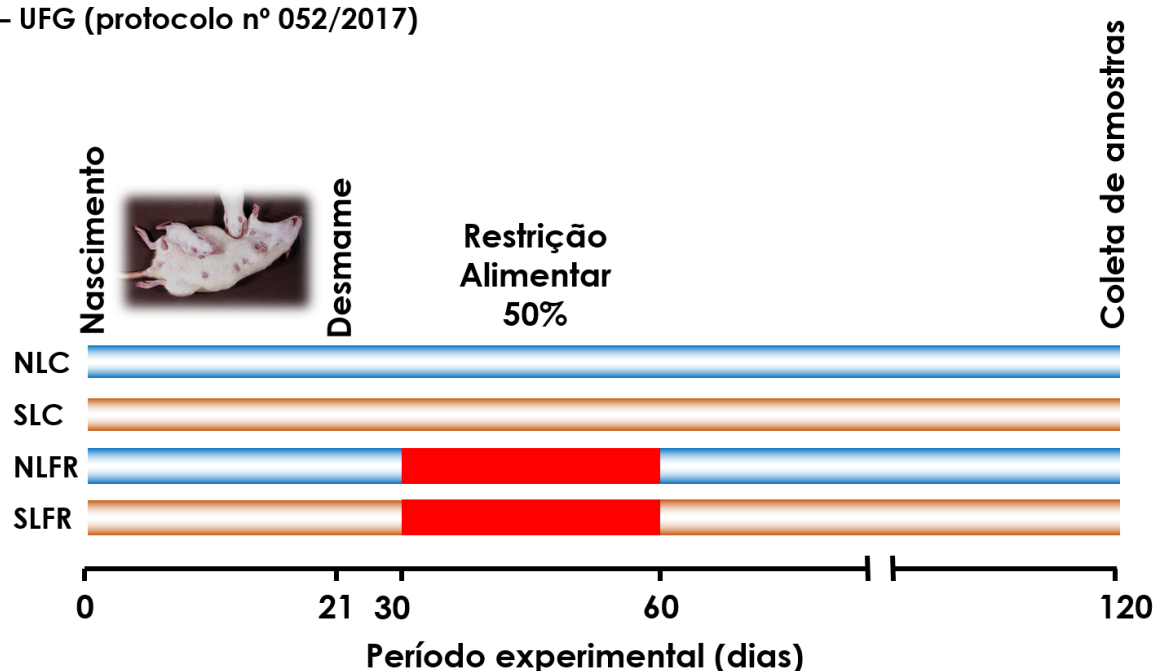


Figura 02: Linha do tempo experimental demonstrando períodos de tratamento dos grupos. Onde os animais SLFR e NLFR foram submetidos a restrição alimentar de 50% no período de 30 a 60 dias de idade, correspondendo a puberdade.

3.2 Avaliação do comportamento tipo-ansiedade

Aos 110 dias de idade os animais foram submetidos a avaliação do efeito tipo ansiedade, onde foi utilizado o protocolo de Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de acordo com o método proposto por Pellow e colaboradores (46). O LCE é um aparelho constituído por dois braços abertos (50 x 10 cm), sem paredes laterais, perpendiculares e dois braços fechados de mesma dimensão, circundados por paredes laterais de 40 cm de altura. Uma pequena parede de 1 cm de altura encontra-

se acoplada ao redor dos braços abertos, a fim de evitar a queda dos animais do equipamento, que é elevado 50 cm do solo. Uma câmera de vídeo foi fixada acima do LCE para filmar o comportamento dos animais. Os ratos foram colocados individualmente na plataforma central do labirinto (com a cabeça direcionada para um dos braços fechados) e ficaram livres para explorar o aparelho por 5 minutos. Os experimentos foram filmados e após cada sessão, o LCE foi limpo (álcool 10%) para evitar interferência de pistas olfativas. Posteriormente, os vídeos foram analisados e foram mensurados o número e tempo de entradas nos braços aberto e braços fechados, o número total de entradas (soma de entradas nos braços abertos e braços fechados) e o tempo da análise de risco (tempo na região central do LCE).

3.3 Avaliação da atividade locomotora e exploratória

Aos 110 dias de idade os animais foram submetidos a avaliação da atividade locomotora e exploratória, que foi realizada de acordo com o método descrito inicialmente por Hall (47). Os animais foram colocados individualmente no campo aberto (CA), dividido em quadrantes (23 cm x 15,5 cm). Uma câmera de vídeo foi fixada acima do campo para filmar o comportamento do rato. Os ratos foram colocados no quadrante central do campo aberto um a um e ficaram livres para explorar o aparelho por 5 minutos. Após cada sessão o CA foi limpo (álcool 10%) para evitar interferência de pistas olfativas. Posteriormente, os filmes foram analisados e foram avaliados os parâmetros de locomoção, autolimpeza, levantadas, tempo de imobilidade, tempo no centro e tempo na periferia do CA.

3.4 Avaliação do comportamento tipo-depressão

Aos 110 dias de idade os animais foram submetidos a avaliação do efeito tipo antidepressivo, pelo protocolo experimental de nado forçado (NF). O protocolo foi adaptado para ratos a partir do modelo proposto originalmente por Porsolt e colaboradores (1977) (48). Os animais foram colocados dentro de um cilindro de PVC (Polyvinyl Chloride) de 24 cm de diâmetro por 60 cm de altura, preenchido por uma coluna d'água de 42 cm de altura, à temperatura de 25 ± 1 °C. No primeiro dia de experimento, o animal é exposto ao cilindro com água (pré-teste), no segundo dia uma câmera foi fixada acima do aparelho para filmar o comportamento do animal, posteriormente o vídeo foi analisado, e foi avaliado o tempo de imobilidade, sendo o

animal considerado imóvel quando apenas executa movimentos suaves com as patas para manter a cabeça fora da água.

3.5 Canulação da artéria femoral e veia cava inferior

Ao final dos protocolos experimentais, 120 dias de idade, animais foram anestesiados com halotano 2% em O₂ a 100%. Cateteres de polietileno (PE 10 ligado a PE 50), preenchidos com solução de heparina (Hepamax, Blau Farmacêutica, Cotia, SP, Brasil) acrescida de penicilina (Benzilpenicilina potássica, Eurofarma, Itapevi, SP, Brasil), foram inseridos na aorta abdominal através artéria femoral e na veia cava inferior através da veia femoral após uma incisão na região ilíaca e divulsionamento dos tecidos para acesso da região, para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP) e a infusão de drogas, respectivamente. Os cateteres foram exteriorizados no dorso dos animais e a sua extremidade oposta foi vedada com pinos de metal. Suturas foram aplicadas nas áreas onde houveram incisões.

3.6 Registro de pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC)

Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, foi realizado o registro dos parâmetros cardiovasculares dos animais não anestesiados e com livre movimentação. O sinal da PAP foi obtido pela conexão do cateter da artéria a um transdutor de pressão (MLT0699, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) acoplado a um amplificador (Bridge Amp, FE221, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os dados foram digitalizados em uma frequência de 2000 amostras/s utilizando um conversor 15 analógico digital (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A pressão arterial média (PAM) foi calculada a partir do sinal da PAP (LabChart 7 v7.3.7; ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A frequência cardíaca (FC) foi obtida através dos sinais de pulso da PAP.

3.7 Eutanásia e coleta de tecidos

Aos 120 dias de idade, uma leva de animais dos 4 grupos experimentais foi submetida a jejum de 12 h, anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg of BW, i.p., Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil) e eutanasiados por exsanguinação para coleta de amostras de sangue, tecido adiposo, coração e glândulas adrenais, e pesagem dos órgãos. Para esses procedimentos experimentais foram utilizados

animais de no mínimo 3 ninhadas diferentes e que não tenham sido usados em outros protocolos experimentais.

3.8 Análises histológicas

Amostras de coração foram seccionadas em cortes não-seriais de 6 µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina para medição do diâmetro dos cardiomiócitos. As análises morfométricas foram feitas utilizando imagens digitalizadas (TIFF 24-bit color, 2560×1920 pixels), obtidas com um microscópio óptico (Olympus BX41, Tokyo, Japan), acoplado a uma câmera (DM500 plus ICC50 HD, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). O diâmetro de 20 cardiomiócitos foram medidos usando 20 imagens (magnificação 1000x) de cada animal (n=5).

Cortes não-seriais de 6 µm de espessura de amostras de coração foram coradas com picrosirius red para mensuração de fibrose intersticial e perivascular. As análises morfométricas foram feitas utilizando imagens digitais (TIFF 24-bit color, 2560×1920 pixels) obtidas a partir de um microscópio óptico (Olympus BX41, Tokyo, Japan) acoplado a uma câmera (DM500 plus ICC50 HD, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A fibrose intersticial e perivascular foi medida utilizando 20 imagens (magnificação 100x), de cada animal (n=5). O índice de fibrose perivascular foi determinado pela relação entre área de fibrose total e a área do lúmen. A porcentagem de fibrose intersticial foi estimada por estereologia, utilizando uma grade de 300 pontos de teste, e a fibrose intersticial foi estimada pela relação entre o número de pontos marcados por colágeno e o número total de pontos de teste. O diâmetro dos cardiomiócitos e o índice de fibrose perivascular foram feitas utilizando o software ICY (Institut Pasteur, Paris, France). Fibrose intersticial foi feita utilizando o software Image Pro Plus v6 (Media Cybernetics, MD, USA).

3.9 Western Blot

Amostras do ventrículo esquerdo (n=4 por grupo, de diferentes ninhadas) foram homogeneizadas em lysis buffer (PBS [137 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4], 8.8 mM IGEPAL CA-630, 12 mM Sodium Deoxycholate, 3.47 mM SDS, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 2.34 µM Leupeptin, 0.154 µM Aprotinin, 1.45 µM Pepstatin) em um homogeneizador de vidro a 4° C por 20 minutos para precipitação do material insolúvel e coleção do sobrenadante. Após a centrifugação, o total de proteínas do sobrenadante foi quantificado através do método Bicinchoninic

Acid (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram desnaturadas em buffer Laemmli (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% Glycerol, 2% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue). Alíquotas de 40 µg de proteína de cada amostra foram separadas através de SDS-PAGE. Após separação as proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose (Amersham Protran, GE Healthcare, Little Chalfont, BUX, UK). As membranas foram encubadas em uma solução bloqueadora (5% leite em pó desnatado, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.02% Tween 20) sendo agitados levemente por 90 minutos a temperatura ambiente, e subsequentemente incubados com HPR-conjugados anticorpos secundários (Tabela 1) por 90 minutos, e cobertos com uma solução quimioluminescente para detecção (Amersham ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, BUX, UK). A quimioluminescência foi detectada através de um sistema de documentação de imagem (ImageQuant LAS 4000 series, GE Healthcare, Chicago, IL, USA), e as imagens foram capturadas. A intensidade das bandas foi quantificada através de densidade óptica relativa, utilizando o software FIJI (ImageJ, NIH, Cambridge, MA, USA), GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) foi utilizado como controle de load.

Tabela 1 Lista de anticorpos utilizados para *Western Immunoblotting*

Anticorpo	Fabricante e # do catálogo	Fonte	Diluição
Anti-AT1R	Santa Cruz, CA, USA (SC-515884)	Mouse monoclonal	1:1000
Anti-AT2R	Booster, CA, USA (M00432)	Rabbit monoclonal	1:1000
Anti-MAS1	Santa Cruz, CA, USA (SC-390453)	Mouse monoclonal	1:1000
Anti-ERK	LifeSpan, WA, USA (LS-C21346)	Rabbit polyclonal	1:1000
Anti-pERK	Santa Cruz, CA, USA (SC-11407)	Rabbit polyclonal	1:2000
Anti-GAPDH	Santa Cruz, CA, USA (SC-25778)	Rabbit polyclonal	1:1000

3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ o erro padrão da média ($M \pm$ EPM). Para a comparação das diferenças entre os grupos experimentais foi usado

ANOVA *one-way*, com aplicação do pós-teste de Tukey e o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. Para isso será usado o software GraphPadPrism® versão 6.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre o peso corporal

Na figura 1 é mostrado o desenvolvimento do peso corporal dos animais durante os 120 dias de idade. Foi observado maior peso corporal dos animais SLC quando comparados aos animais NLC ao longo de o período experimental, já sendo observadas diferenças estatisticamente significativas aos 30 dias de idade (NLC $80,6 \pm 2,5$ g vs SLC $96,2 \pm 2,7$ g; $p < 0,001$; Fig. 3B), quando o tratamento de restrição alimentar foi iniciado. Aos 60 dias de idade, fim do tratamento de restrição alimentar, a diferença entre os animais SLC e NLC ainda era notável (NLC $247,9 \pm 4,2$ g vs SLC $274,7 \pm 4,7$ g; $p < 0,001$; Fig. 3C). Porém, os resultados mais expressivamente diferentes foram dos animais submetidos a restrição alimentar quando comparados aos não submetidos a restrição alimentar, onde ambos os grupos se apresentaram com o peso significativamente menor comparados aos seus respectivos grupos controles (NLC $247,9 \pm 4,2$ g vs NLFR $136,9 \pm 2,8$ g; $p < 0,0001$; Fig. 3C) e (SLC $274,7 \pm 4,7$ g vs SLFR $149,3 \pm 3,1$ g; $p < 0,0001$; Fig. 3C). Ao fim do tratamento, com 120 dias de idade (Fig. 3D), observou-se que os animais NLFR e SLFR recuperaram o peso de acordo com seus respectivos controles, passando por um expressivo *catch up* de ganho de peso corporal (NLC $360,4 \pm 13,6$ g vs NLFR $348,7 \pm 7,8$ g, ns.; Fig. 3D) e (SLC $412,6 \pm 8,2$ g vs SLFR $400,7 \pm 7,1$ g; ns.; Fig. 3D). Esse parâmetro é melhor observado no delta de ganho de peso realizado entre os dias 60 a 120 (NLC $122,2 \pm 12,8$ g vs NLFR $211,8 \pm 8,4$ g; $p < 0,0001$; Fig. 3E) e (SLC $151,8 \pm 5,8$ g vs SLFR $241,9 \pm 9,4$ g; $p < 0,001$; Fig. 3E).

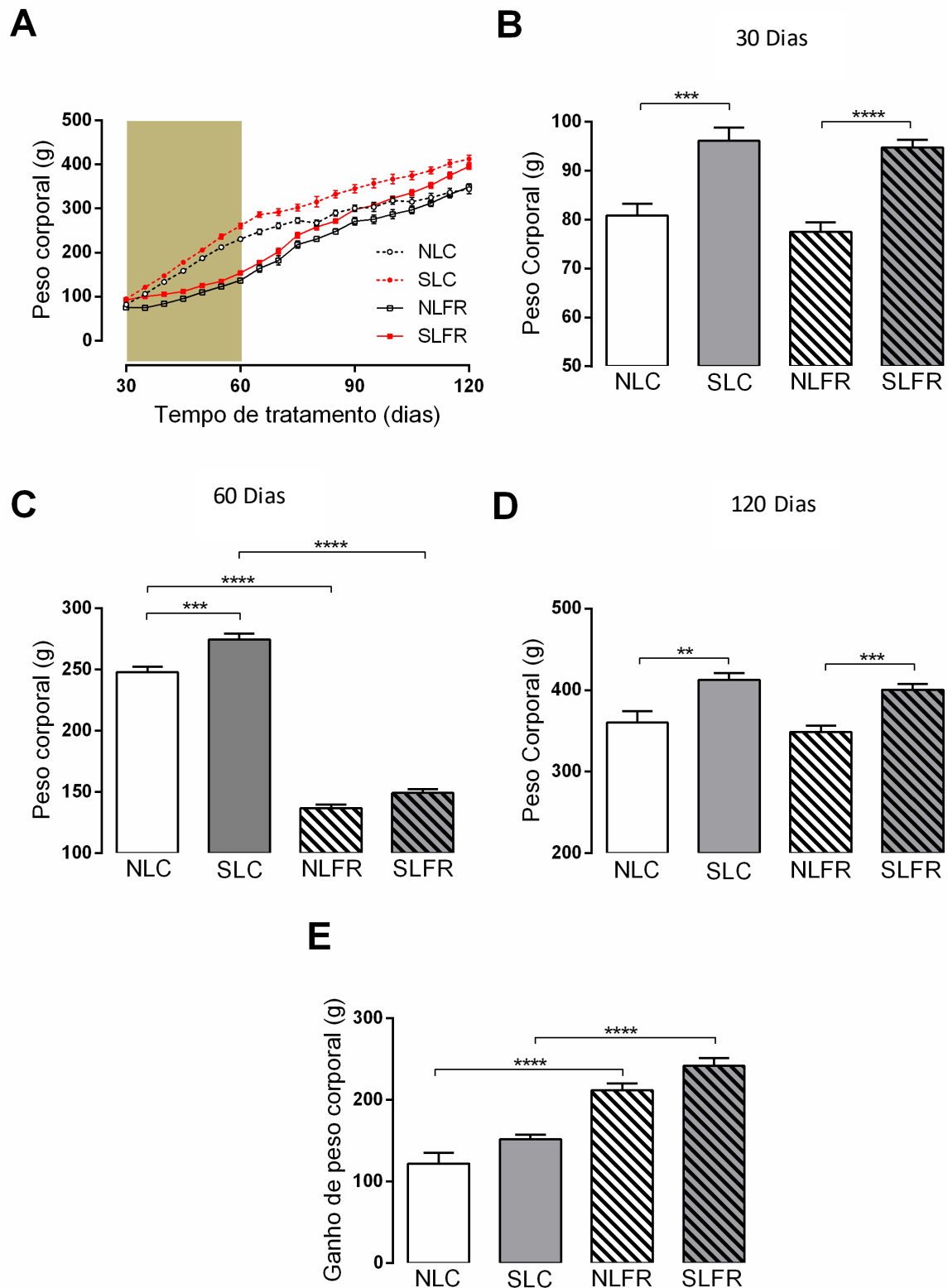


Figura 03: Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar no peso corporal. Curva do peso corporal durante todo período experimental (A), peso corporal 30 dias de idade (B), peso corporal 60 dias de idade (C), peso corporal 120 dias de idade (D), delta do ganho de peso dos 60 aos 120 dias de idade (E). Dados expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA pós-teste de Tukey ($n=8-10$ /grupo). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$.

4.2 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre a ingestão alimentar

Os animais SLC apresentaram persistente hiperfagia durante todo o período experimental (Fig. 4A). Enquanto durante o tratamento por restrição alimentar os animais foram artificialmente mantidos com o consumo alimentar diminuído (NLC $610,6 \pm 15,6$ g vs NLFR $306,3 \pm 2,8$ g; $p < 0,0001$; Fig. 4B) e (SLC $680,3 \pm 19,2$ g vs SLFR $340,8 \pm 2,75$ g; $p < 0,0001$; Fig. 4B). Após o fim do tratamento os níveis de consumo alimentar retornaram a valores comparáveis a seus respectivos controles, permanecendo os animais dos grupos SLC e SLFR hiperfágicos (NLC 1270 ± 60 g vs NLFR $1189 \pm 41,7$ g; ns; Fig. 4C) e (SLC $1652 \pm 20,88$ g vs SLFR $1555 \pm 18,37$ g; ns; Fig. 4C).

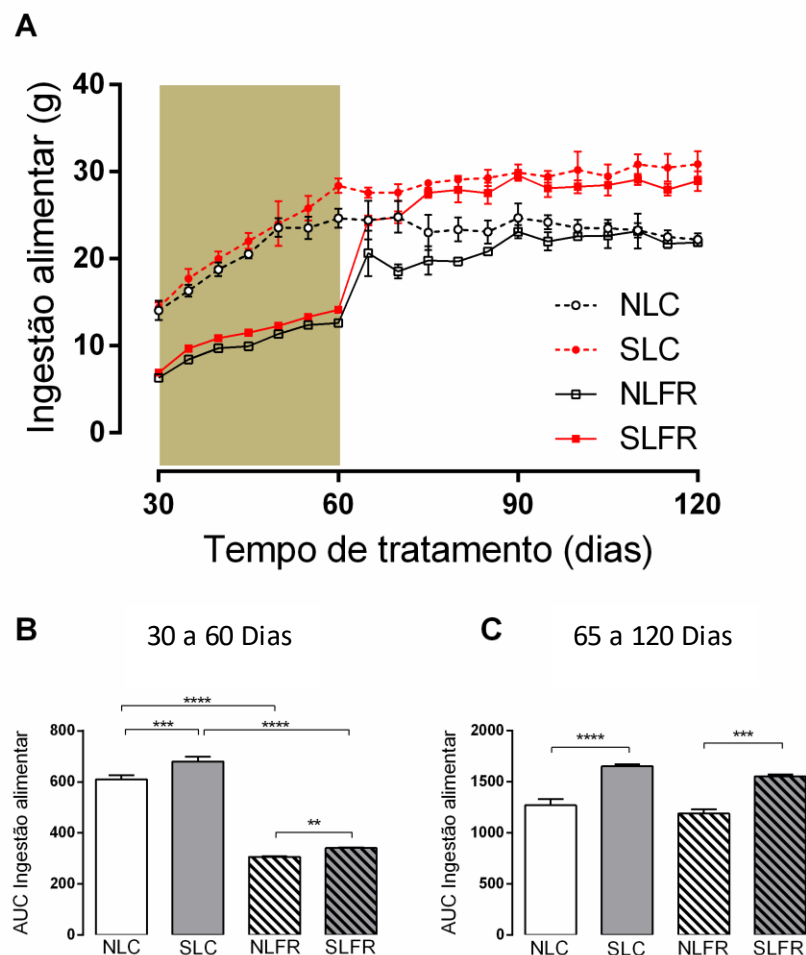


Figura 04: Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar na ingestão alimentar. Curva ingestão alimentar durante todo período experimental (**A**), área sob a curva dos dias 30 a 60 (**B**), área sob a curva dos dias 65 a 120 (**C**). Dados expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA pós-teste de Tukey ($n=8-10$ /grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.3 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre a gordura corporal

A programação metabólica por redução de ninhada produziu efeitos observáveis nos depósitos de tecido adiposo branco nos animais SLC, quando comparados aos animais NLC, corroborando os resultados que apontaram para sobrepeso nestes grupos para o fenótipo de obesidade (NLC $2529 \pm 256,9$ mg vs SLC $4657 \pm 338,3$ mg; $p < 0,0001$; Fig. 5A), (NLC $2133 \pm 270,3$ mg vs SLC 4777 ± 448 mg; $p < 0,0001$; Fig. 5B), (NLC $2121 \pm 145,6$ mg vs SLC $4355 \pm 250,6$ mg; $p < 0,0001$; Fig. 5C), (NLC $854,8 \pm 69,7$ mg vs SLC $2774 \pm 245,9$ mg; $p < 0,0001$; Fig. 5D) Ao fim do tratamento, não houve redução considerável de adiposidade nos animais submetidos a restrição alimentar, salvo pela gordura mesentérica, onde os animais SLFR apresentaram uma diminuição no peso dos depósitos (SLC $4355 \pm 250,6$ mg vs SLFR $3525 \pm 158,6$ mg; $p < 0,05$; Fig. 5C).

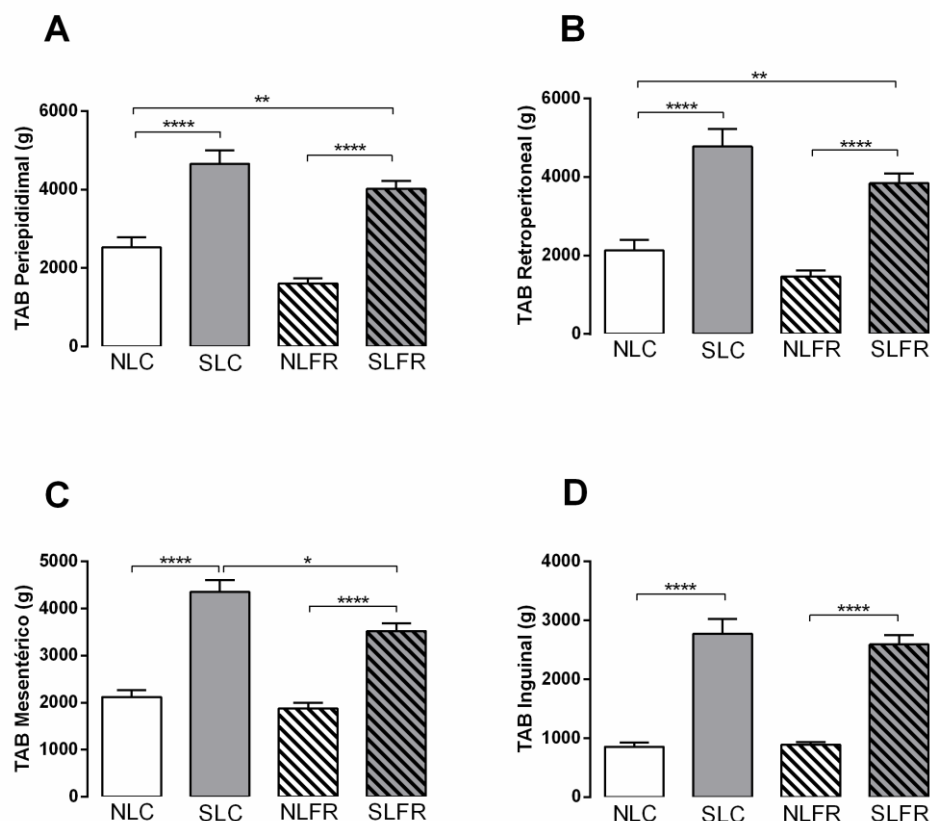


Figura 05: Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar no peso dos depósitos de gordura. Gordura periepididimal (**A**), Gordura retroperitoneal (**B**), Gordura mesentérica (**C**), Gordura inguinal (**D**). Dados expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA pós-teste de Tukey ($n=8-10$ /grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$

4.4 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre o comportamento de ansiedade a partir do teste de labirinto em cruz

Os animais do grupo SLC apresentaram comportamentos tipo-ansiedade, refletidos na relutância de tomarem parte em comportamentos de risco, como frequentar os braços abertos do aparelho onde através da tigmotaxia os animais se sentem expostos ao risco, dessa forma houve significativa redução no número de entradas nos braços abertos (SLC $6,43 \pm 0,7$ vs NLC $8,8 \pm 0,7$; $p < 0,05$; Fig. 6B). Os animais SLC permaneceram por mais tempo nos braços fechados em relação aos animais NLC (SLC $177,1 \pm 15,3$ vs NLC $126,7 \pm 10,3$; $p < 0,05$; Fig. 6C). Interessantemente, os animais SLC apresentaram um menor número de entradas totais (SLC $12,9 \pm 1,1$ vs NLC $16,6 \pm 1$; $p < 0,05$; Fig. 6E) e não houve diferença no tempo despendido nos braços abertos e no centro nos animais SLC comparados aos NLC (Fig. 6A e 6F). Já nos animais SLFR observamos uma atenuação do quadro ansiogênico, ou seja, os animais foram menos relutantes em explorar o ambiente de risco nos braços abertos (SLFR $125,2 \pm 12,9$ vs SLC $177,1 \pm 15,3$; $p < 0,01$; Fig. 6C). Ao contrário, os animais NLFR demonstraram maior relutância em frequentar os braços abertos do aparelho quando comparados aos animais controle NLC (NLFR $60,80 \pm 5,7$ vs NLC $117,1 \pm 8,03$; $p < 0,01$; Fig. 6A). Adicionalmente, observamos comportamento de hipervigilância nos animais SLFR, tendo despendido mais tempo no centro quando comparado aos animais SLC (SLFR $79,25 \pm 5,1$ vs SLC $61,03 \pm 4,2$; $p < 0,05$; Fig. 6F).

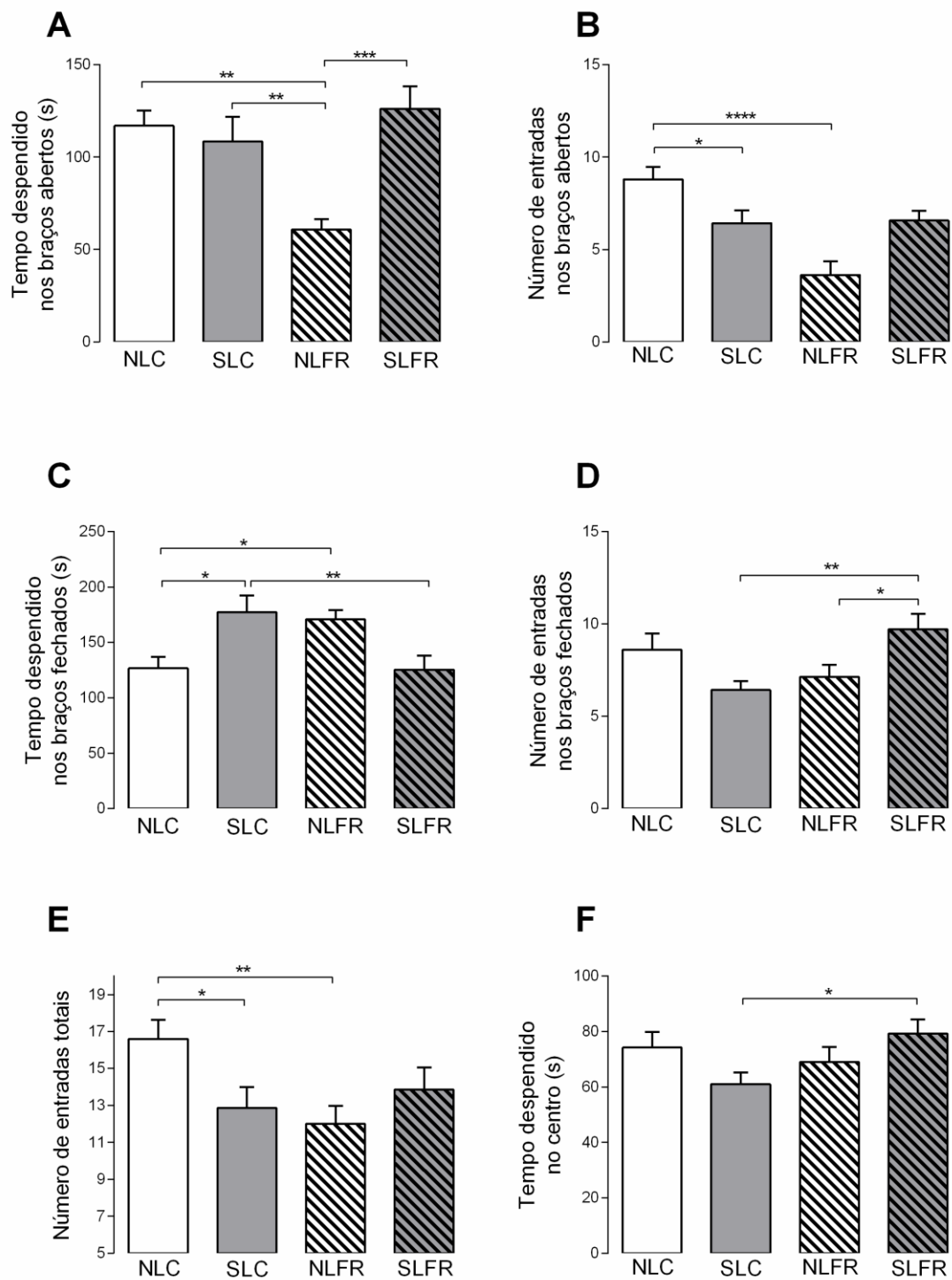


Figura 06: Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar nos parâmetros comportamentais utilizando labirinto em cruz. Tempo nos braços abertos (**A**), nº de entradas nos braços abertos (**B**), tempo nos braços fechados (**C**), nº de entradas nos braços fechados (**D**), nº de entradas totais (**E**), tempo no centro (**F**). Dados expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA pós-teste de Tukey (n=8-10/grupo). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001.

4.5 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre o comportamento de ansiedade e locomoção/exploração a partir do teste de campo aberto

Os dados obtidos através do teste de campo aberto corroboram os que foram obtidos pelo labirinto em cruz. Quando analisamos o tempo despendido na periferia, parâmetro que indica comportamento tipo-ansiedade, ambos os grupos obesos e o grupo não obeso submetido a restrição alimentar permaneceram na periferia por mais tempo em comparação aos animais NLC (NLC $226,4 \pm 8,08$ vs SLC $278,7 \pm 5,3$; $p < 0,0001$; Fig. 7A), (NLC $226,4 \pm 8,08$ vs SLFR $276,1 \pm 4,35$; $p < 0,0001$; Fig. 7A) e (NLC $226,4 \pm 8,08$ vs NLFR $284 \pm 1,35$; $p < 0,0001$; Fig. 7A). Complementarmente, o tempo despendido no centro foi distribuído de forma similar (Fig. 7B). Curiosamente, ambos os grupos que passaram por restrição alimentar apresentam menor tempo de imobilidade do que os animais NLC (NLC $23,09 \pm 5,04$ vs SLFR $2,04 \pm 0,7$; $p < 0,0001$; Fig. 7C) e (NLC $23,09 \pm 5,04$ vs NLFR $3,86 \pm 1,7$; $p < 0,05$; Fig. 7C), mesmo não havendo alterações nos outros parâmetros de mobilidade, como o número de cruzamentos, o número de levantadas e o número de auto-limpezas.

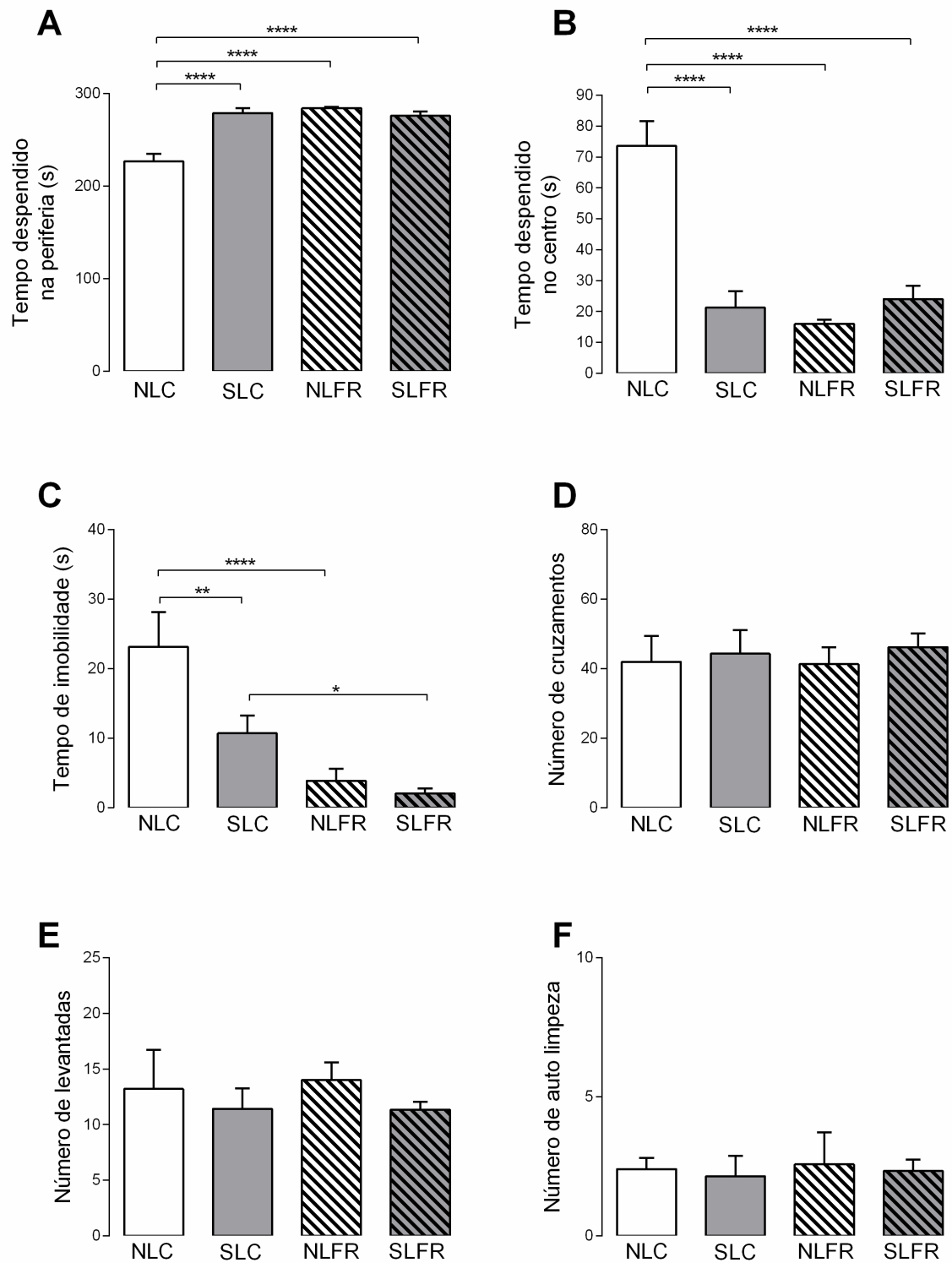


Figura 07: Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar nos parâmetros comportamentais utilizando campo aberto. Tempo na periferia (A), tempo no centro (B), tempo de imobilidade(C), nº de cruzamentos (D), nº de cruzamentos (E), nº de auto-limpezas (F). Dados expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA pós-teste de Tukey (n=8-10/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.6 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre o comportamento de depressão a partir do teste nado forçado

Os resultados do nado forçado apontam um comportamento tipo-depressão nos animais SLC, devido ao aumento no tempo de imobilidade quando comparado ao grupo NLC (NLC $69,47 \pm 6$ vs SLC $89,58 \pm 10,7$; $p < 0,05$; Fig. 8), como o esperado de acordo com a literatura. Interessantemente, a restrição alimentar aparenta ter tido um efeito tipo-antidepressivo no grupo programado metabolicamente (NLC $69,47 \pm 6$ vs SLFR $45,58 \pm 4,1$; $p < 0,01$; Fig. 8) e não-programado em comparação ao NLC (NLC $69,47 \pm 6$ vs NLFR $61,26 \pm 4,09$; n.s.; Fig. 8).

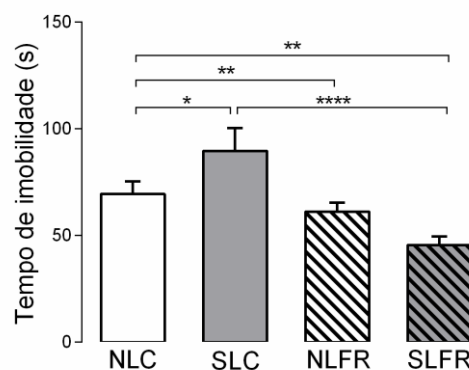


Figura 08: Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar nos parâmetros comportamentais de depressão utilizando nado forçado. Dados expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA pós-teste de Tukey (n=8-10/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.7 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre a pressão arterial

Durante as análises dos parâmetros cardiovasculares, foi observada elevação da pressão arterial sistólica (NLC $120,6 \pm 0,55$ vs SLC $149,1 \pm 5,9$; $p < 0,001$; Fig. 9B), da pressão arterial diastólica (NLC $86,96 \pm 0,9$ vs SLC $106 \pm 3,6$; $p < 0,01$; Fig. 9A) e da pressão arterial média (NLC $99,26 \pm 0,77$ vs SLC $121,4 \pm 5,7$; $p < 0,01$; Fig. 9C) nos animais SLC, comparados aos animais NLC. Não houve alteração destes parâmetros nos animais NLFR em relação aos NLC, e também não observamos alteração nos animais SLFR quando comparados aos animais SLC (Fig. 9A – 9C). A frequência cardíaca se mostrou inalterada em todos os grupos comparados aos animais NLC (Fig. 9D).

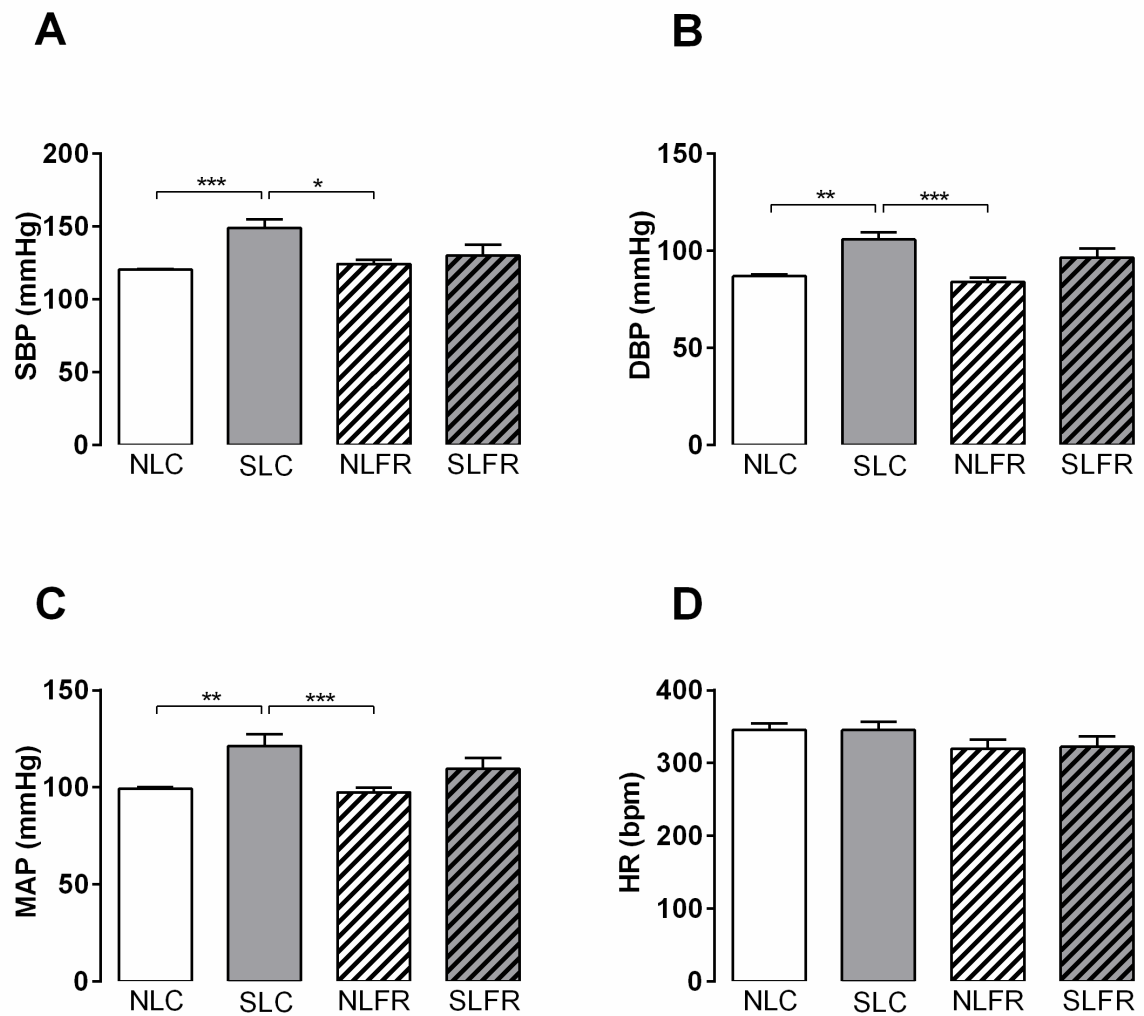


Figura 09: Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar nos parâmetros cardiovasculares. Pressão arterial sistólica (**A**), pressão arterial sistólica (**B**), pressão arterial média (**C**), frequência cardíaca (**D**). Dados expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA pós-teste de Tukey (n=8-10/grupo). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001.

4.8 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre a morfologia cardíaca

Durante as análises dos parâmetros podemos observar os impactos do tratamento sobre a morfologia cardíaca. O diâmetro dos cardiomiócitos estava aumentado nos grupos SLC, NLFR e SLFR (NLC $46,52 \pm 4,6 \mu\text{m}$ vs SLC $50,99 \pm 4,5 \mu\text{m}$; $p < 0,05$; Fig. 10A), (NLC $46,52 \pm 4,6 \mu\text{m}$ vs NLFR $53,24 \pm 4,9 \mu\text{m}$; $p < 0,001$; Fig. 10A), (NLC $46,52 \pm 4,6 \mu\text{m}$ vs SLFR $55,16 \pm 5,13 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$; Fig. 10A), com achados similares com relação a fibrose perivascular (NLC $2,3 \pm 0,67 \%$ vs SLC $7,0 \pm 2,7 \%$; $p < 0,001$; Fig. 10B), (NLC $2,3 \pm 0,67 \%$ vs NLFR $8,01 \pm 1,5 \%$; $p < 0,001$; Fig. 10B), (NLC $2,3 \pm 0,67 \%$ vs SLFR $7,55 \pm 2,7 \%$; $p < 0,001$; Fig. 10B), e também com relação a fibrose intersticial (NLC $1,92 \pm 0,62 \%$ vs SLC $4,74 \pm 1,12 \%$; $p < 0,0001$; Fig. 10C), (NLC $1,92 \pm 0,62 \%$ vs NLFR $10,98 \pm 1,86 \%$; $p < 0,0001$; Fig. 10C), (NLC $1,92 \pm 0,62 \%$ vs SLFR $8,50 \pm 1,19 \%$; $p < 0,0001$; Fig. 10C), indicando remodelamento do miocárdio.

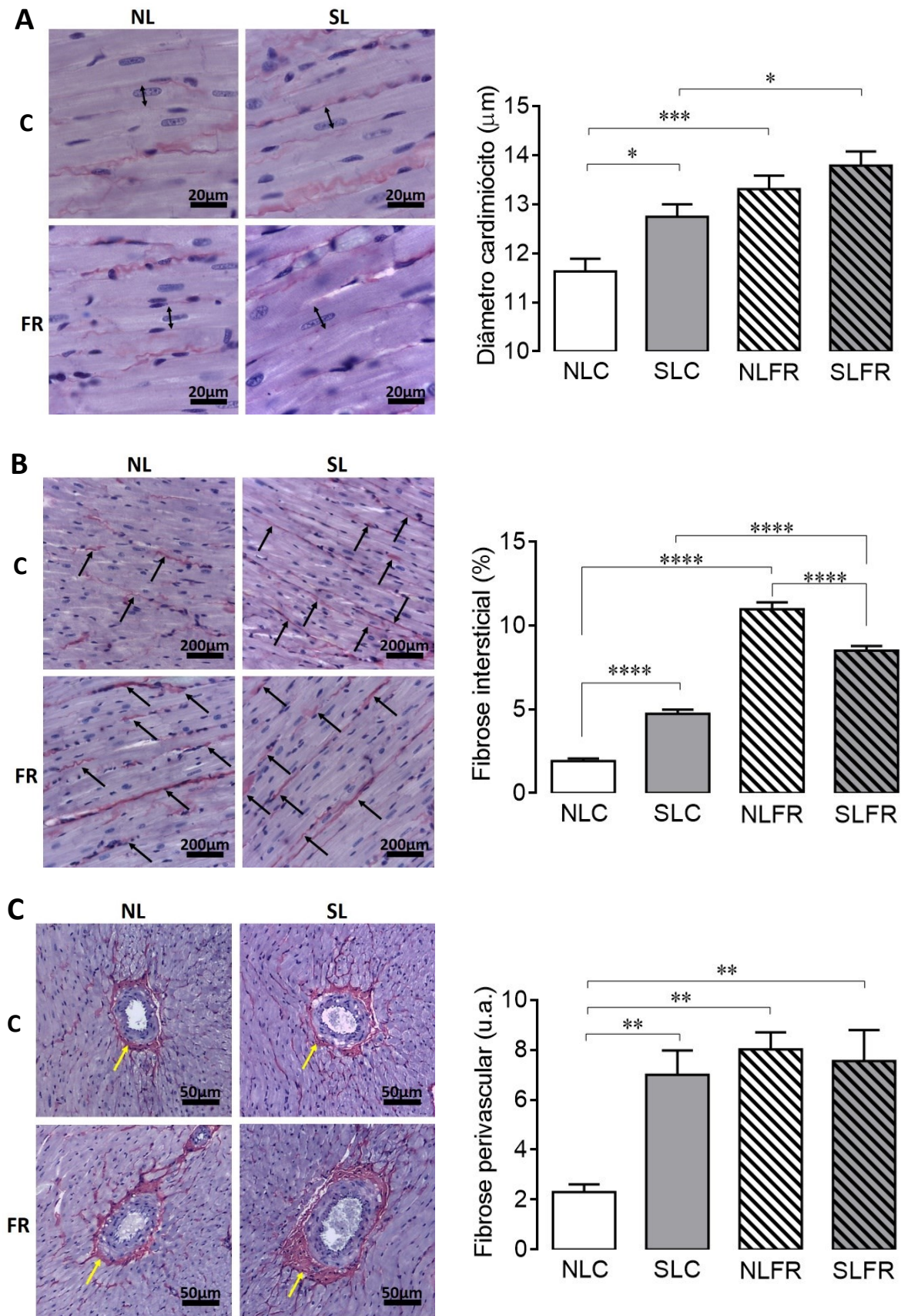


Figura 10: Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar sob a morfologia cardiovascular. Diâmetro dos cardiomiócitos (A), fibrose intersticial (B), fibrose perivascular (C). Dados expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA pós-teste de Tukey (n=8-10/grupo). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001.

4.9 Efeito da redução de ninhada e da restrição alimentar sobre a expressão proteica dos receptores do SRA e da MAPK / ERK

As análises por *western blot* elucidaram os efeitos dos tratamentos sob o sistema renina-angiotensina (SRA), assim como na expressão das proteínas ERK e p-ERK. Considerando a expressão de AT1, é possível ver um aumento na expressão no grupo NLFR quando comparado ao controle (NLC $97,58 \pm 9,03$ % vs NLFR $165,6 \pm 24,90$ %; $p < 0,001$; Fig. 11A). Na análise da expressão de AT2 observamos um aumento na expressão em ambos os grupos submetidos a restrição alimentar (NLC $98,61 \pm 3,05$ % vs NLFR $218,2 \pm 10,85$ %; $p < 0,0001$; Fig. 11B), (NLC $98,61 \pm 3,05$ % vs SLFR $224,0 \pm 52,96$ %; $p < 0,001$; Fig. 11B). Não houveram diferenças observáveis com relação a expressão de MAS-R (Fig. 11C).

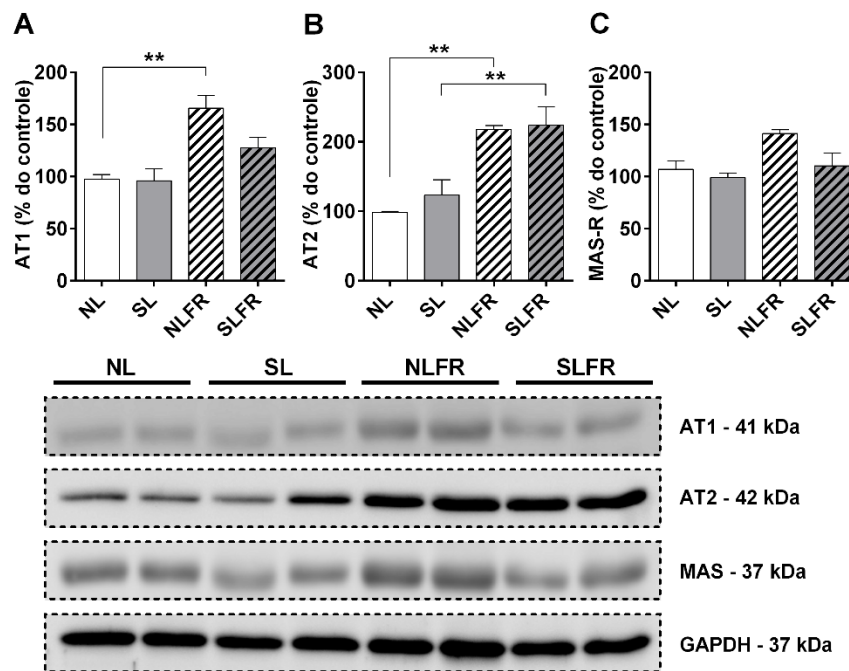


Figura 11: Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar sob a expressão proteica dos receptores AT1, AT2 e MAS. Expressão de AT1(**A**), Expressão de AT2 (**B**), Expressão de MAS-R (**C**). Dados expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA pós-teste de Tukey (n=8-10/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Considerando a expressão de p-ERK, é possível notar um aumento na expressão desta proteína em ambos os grupos expostos a restrição alimentar (NLC $90,05 \pm 15,62$ % vs NLFR $210,5 \pm 28,10$ %; $p < 0,0001$; Fig. 12A), (NLC $90,05 \pm 15,62$ % vs SLFR $186,6 \pm 38,85$ %; $p < 0,001$; Fig. 12A). A expressão de ERK total também foi maior (NLC $94,18 \pm 12,96$ % vs NLFR $219,3 \pm 12,83$ %; $p < 0,0001$; Fig. 12B), (NLC $94,18 \pm 12,96$ % vs SLFR $162,9 \pm 39,74$ %; $p < 0,001$; Fig. 12B). Não houve alterações significativas com relação a razão entre ERK e p-ERK (Fig. 12C).

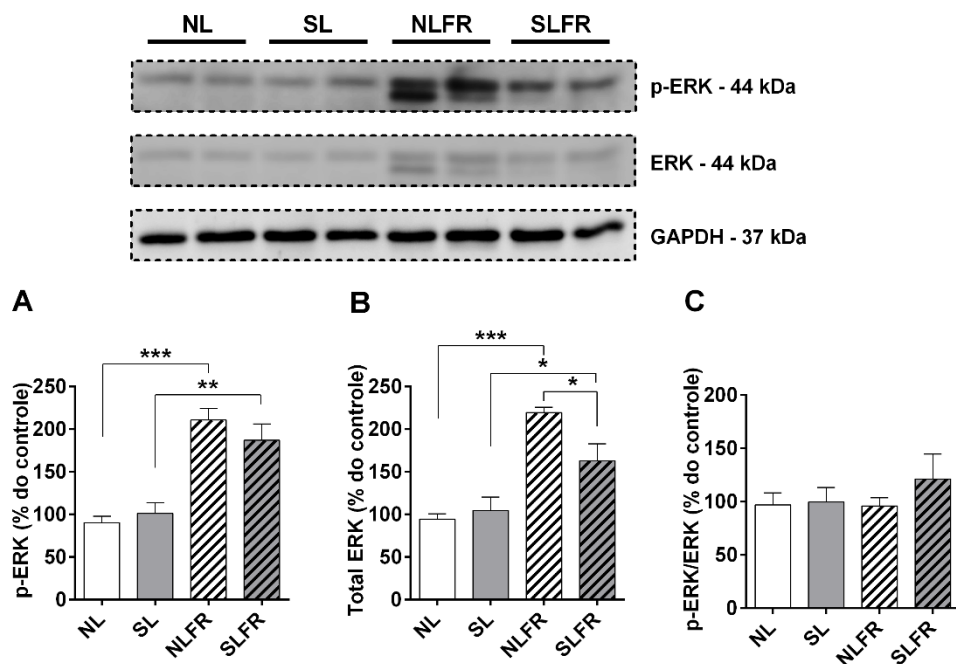


Figura 12: Efeitos da programação metabólica e restrição alimentar sob a expressão proteica de ERK e p-ERK. Expressão de p-ERK (A), Expressão de ERK (B), razão entre a expressão de p-ERK e ERK (C). Dados expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA pós-teste de Tukey (n=8-10/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi observado que animais programados metabolicamente e não programados metabolicamente reagem de forma diferente ao estímulo da restrição alimentar. Tendo sido observado que não houve reversão do fenótipo de obesidade quando analisados os parâmetros biométricos tais como o peso e depósitos de gordura, inclusive mantendo-se hiperfágicos como é esperado do modelo SL (29), e ganhando peso rapidamente após o fim do período de restrição alimentar. Contudo, pela primeira vez foi demonstrado que a restrição alimentar de 50%, durante a puberdade, é capaz de produzir alterações comportamentais e cardiovasculares permanentes em animais não obesos.

Os animais do grupo SL apresentaram sobrepeso durante todo o período experimental. De fato, ratos submetidos a redução de ninhada durante a lactação, como efetuada nesse estudo, apresentam maior peso corporal o que corrobora com a literatura vigente (26,28,29). Os animais submetidos a restrição alimentar não apresentaram mudanças de longo prazo em relação ao peso corporal tendo sido observada uma recuperação do peso dos animais após o período de restrição; porém, o peso corporal foi mantido dentro da normalidade esperada quando comparados aos seus respectivos grupos controles e até o fim do período experimental de 120 dias, sendo então razoável afirmar que não houve mudanças no fenótipo de obesidade dos animais SL, e não houve alterações nesses parâmetro nos animais NL submetidos a restrição alimentar. Um estudo demonstrou que a normalização da ingesta alimentar após a programação metabólica através da utilização de uma fórmula de leite hipercalórica em filhotes não foi capaz de reverter a programação metabólica, porém melhorando certos parâmetros como o peso corporal nestes animais (49). Por outro lado, é importante ressaltar que este estudo difere deste nas questões de tempo de tratamento e intensidade da restrição, e estes podem ser fatores determinantes. Recentemente, nosso grupo mostrou que animais submetidos a restrição proteica durante a puberdade provocou redução do peso corporal aos 60 dias de idade, porém retornando a pesos similares aos de seus controles aos 120 dias (50).

Estudos mostram que animais SL apresentam persistente hiperfagia característica do modelo, não havendo reversão do comportamento alimentar após o fim do tratamento (24,29). Em nosso estudo, após findado o período de restrição

alimentar e ao longo de todo o período de recuperação, os animais submetidos a restrição alimentar apresentaram os mesmos valores de ingestão alimentar de seus respectivos controles, indicando que a restrição alimentar durante a puberdade não possui a capacidade de modular o comportamento alimentar de maneira permanente durante a vida adulta, o que é também corroborado pela rápida recuperação e normalização do peso destes animais após o fim do tratamento. Este perfil de normalização da ingestão alimentar após os 60 dias de recuperação após a restrição alimentar também foi observado no trabalho de Oliveira, *et al.* 2018, onde os animais foram submetidos a uma restrição proteica durante a puberdade, e ao fim do período experimental de 120 dias demonstraram-se com a ingestão alimentar similar a dos animais controle. Também é importante notar que a puberdade é uma fase particularmente suscetível a desordens alimentares como anorexia e bulimia (42), o que torna esta fase particularmente interessante para estudos relacionados a programação metabólica, pois a plasticidade epigenética presente nessa fase já foi constatada, e a perturbação nutricional representada pelas desordens alimentares é comum na nossa sociedade.

Como demonstrado por Moreira *et al.*, 2009 os animais submetidos a supernutrição precoce desenvolveram hipertrofia cardíaca. Neste estudo também observamos hipertrofia dos cardiomiócitos, acompanhado por fibrose intersticial e perivascular nos grupos submetidos a restrição alimentar assim como nos animais obesos, sendo que os animais dos grupos restrição aparentam apresentar um pior prognóstico do que os animais obesos. Remodelamento cardiovascular e hipertrofia são associados a aumentos na pressão arterial, como forma de compensação adaptativa (51) e este processo leva ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares através de mudanças estruturais e fisiológicas permanentes (52). Como esperado, os animais obesos apresentaram aumento da pressão arterial, como já demonstrado previamente (53). Contudo, os animais submetidos a restrição alimentar apresentam estas alterações relacionadas ao remodelamento cardíaco, sem apresentarem mudanças na pressão arterial, o que indica que se tratam de dois mecanismos diferentes, culminando nas mesmas alterações patológicas ao miocárdio.

Um dos mecanismos potencialmente envolvidos em tais alterações é o sistema renina-angiotensina, tendo em vista os múltiplos efeitos deletérios que a expressão aumentada de receptores de angiotensina II tipo 1 podem ter, estes receptores são expressos diretamente no tecido cardíaco e estimulam cascatas pró-inflamatórias, que por vez estimulam crescimento e proliferação celular, culminando em remodelamento cardíaco e desenvolvimento de fibrose, o que leva a diminuição da função contrátil (13). Neste estudo foi observado um aumento na expressão tanto dos receptores tipo 1 quanto dos receptores do tipo 2 no miocárdio dos animais submetidos a restrição alimentar severa, o que indica tanto a ativação das vias que levam a efeitos deletérios tais como vasoconstrição e hipertrofia dos cardiomiócitos, assim como de vias compensatórias, vendo que a ativação do receptor AT2 tem ação antiproliferativa. Quando ativados os receptores AT1 podem ativar vias de sinalização intracelular ligadas às MAPK. Uma importante MAPK é a proteína ERK, que está mais diretamente ligada ao desenvolvimento de hipertrofia nos cardiomiócitos (14), que também estava superexpresso nos animais submetidos a restrição alimentar. Estes dados sugerem que esta injúria nutricional foi capaz de gerar programação metabólica e provém um link entre desordens alimentares durante a puberdade e o aparecimento de doenças cardiovasculares na vida adulta.

A conexão entre a obesidade e inflamação já é bem estabelecida na literatura, foi demonstrado em modelos animais e humanos aumentos na expressão e secreção da citocina pró-inflamatória TNF α no tecido adiposo induzidos pela obesidade (54,55,55). Posteriormente, foram encontradas correlações entre a expressão de dezenas de genes codificadores de proteínas inflamatórias e a adiposidade. Interessantemente, evidências apontam para uma conexão entre as desordens de humor e a inflamação; dessa forma, a inflamação pode ser um possível fator etiológico no desenvolvimento da depressão (56,57). Adicionalmente, foi demonstrado uma associação bidirecional entre a inflamação e as desordens de humor, responsável por um *loop* de *feedback* positivo, onde estresse emocional, psicológico ou físico causam respostas inflamatórias (16,58,59). Tendo em vista estes resultados, a conexão entre a obesidade e desordens de humor se torna clara, como demonstrado em estudos populacionais como o desenvolvido recentemente por Cho e colaboradores (60). Os resultados obtidos no nosso estudo contribuem com a literatura nesse aspecto, pois os animais SLC apresentaram comportamentos tipo-ansiedade e tipo-depressão,

devido à redução do comportamento de exploração nos testes de labirinto em cruz elevado, campo aberto e nado forçado. Adicionalmente, observou-se atenuação do comportamento tipo-ansiedade nos animais SLFR que foram expostos a restrição alimentar durante a puberdade, além disso houve a reversão do comportamento tipo-depressão. Dessa forma, podemos sugerir que a programação metabólica afeta a resposta destes animais ao fator estressor da restrição alimentar severa, sendo possível conjecturar a existência de um link entre a restrição alimentar e a redução da produção de citocinas inflamatórias durante o período da puberdade. Possivelmente a redução da adiposidade e a manutenção baixa de peso em comparação aos animais obesos controle durante o período de tratamento se correlaciona com a atenuação do processo inflamatório.

Contudo, os animais NLFR também apresentaram comportamento tipo-ansiogênico, com menor número de entradas e tempo despendido nos braços abertos do labirinto em cruz associado ao maior tempo despendido na periferia do campo aberto demonstrando então um quadro geral de ansiedade. Assim, podemos sugerir que os mecanismos envolvidos na etiologia da ansiedade diferem entre os grupos submetidos a restrição alimentar durante a puberdade. Possivelmente, os animais NLFR desenvolveram um quadro de hipercortisolemia e maior ativação do eixo HPA causado pelo estresse da restrição alimentar. Estudos já demonstraram uma relação entre altos níveis de cortisol circulantes e alterações comportamentais em animais programados metabolicamente através da exposição materna a HFD (61).

Os efeitos benéficos da restrição calórica vêm sendo estudados a décadas (62), onde foram originalmente observados impactos na expectativa de vida relacionados a redução de ingestão alimentar em ratos, contudo tais estudos são conduzidos com restrições brandas, usualmente entre 20 e 30%, em contraste com a restrição mais severa de 50% utilizada neste estudo. O efeito causador de estresse dessa dieta é claramente observável nos animais NLFR, que desenvolveram um quadro de ansiedade, porém os animais SLFR aparentam ter apresentado um abrandamento de certos parâmetros classicamente associados ao modelo de obesidade SL, tais como a depressão, indicando que estes animais obesos encontram-se melhor equipados para lidar com situações de restrição alimentar severa e que os efeitos benéficos da

restrição alimentar, nestes animais e quando analisando o contexto comportamental, se sobressaem aos efeitos estressores.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho, observamos alterações cardiovasculares a longo prazo nos animais submetidos a restrição alimentar severa, o que indica que o potente fator estressor representado por esta dieta tem potencial programador, causando efeitos deletérios como remodelamento cardíaco causada por desregulações no sistema renina-angiotensina, que causam aumento da expressão da ERK e p-ERK, causando por fim hipertrofia, fibrose e potencialmente afetando a função contrátil nestes animais.

Portanto chegamos à conclusão que a restrição alimentar severa durante a puberdade tem potencial programador, e pela primeira vez demonstrando uma conexão entre desordens alimentares durante a puberdade e o aparecimento de doenças cardiovasculares na vida adulta. Estudos adicionais são necessários para maior compreensão tanto as respostas metabólicas neste modelo quanto os possíveis mecanismos pela qual estes processos acontecem, assim como se estes resultados são replicáveis em modelos humanos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando observamos o quadro geral dos animais submetidos a restrição alimentar severa durante a puberdade podemos afirmar que se trata de uma dieta que pode causar efeitos comportamentais e cardiovasculares deletérios permanentes nos animais não obesos. Contudo, é capaz de provocar melhoras em alguns parâmetros comportamentais. Sendo assim o presente estudo demonstrou que a obesidade altera de forma significativa como o organismo reage as pressões externas tais como a baixa disponibilidade de nutrientes, assim como as consequências deletérias de tais dietas em animais não obesos, corroborando com a literatura a plasticidade epigenética da fase da puberdade, com a modulação de parâmetros comportamentais e cardiometabólicos na vida adulta.

8. ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 10 de julho de 2017.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO N. 052/17

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Mestrado

II - Identificação:

- ☐ **Data de apresentação a CEUA:** 18/04/17
- ☐ **Título do projeto:** Efeitos cardiométricos e comportamentais da restrição calórica/alimentar durante a puberdade em ratos obesos
- ☐ **Pesquisador Coordenador no SAP:** Rodrigo Mello Gomes
- ☐ **Pesquisador Responsável/ Unidade:** Letícia Chavaglia Cavalet/ ICB-UFG
- ☐ **Pesquisadores Participantes:** Gustavo Rodrigues Pedrino
- ☐ **Médico Veterinário/CRMV:** Taís Andrade Dias de Souza/4830
- ☐ **Unidade onde será realizado:** ICB/UFG

III - Objetivos e justificativa do projeto:

De acordo com o autor,

Justificativa: Compreender os mecanismos da síndrome metabólica contribui para com a redução da incidência de patologias cardiometabólicas. Nesse sentido se faz necessário estudos que possam aprofundar o conhecimento dos mecanismos envolvidos na programação metabólica durante as principais fases do desenvolvimento, tais como, a gestação, lactação e puberdade. Sobretudo, os efeitos da dieta hipocalórica, principalmente por indivíduos obesos.

Objetivos: Investigar os efeitos cardiometabólicos e comportamentais da restrição calórico/alimentar durante a puberdade, dos 30 aos 60 dias de idade, em ratos obesos.

Objetivos específicos: Avaliar em ratos submetidos a restrição calórico/alimentar durante a puberdade:

O comportamento alimentar, a evolução do peso corporal, a adiposidade visceral e subcutânea e o perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicérides);

Os parâmetros sanguíneos de glicemia, insulinemia, vasopressina e leptinemia de jejum, sensibilidade à insulina através do cálculo do índice HOMA e do teste de tolerância à insulina (kitt) e a tolerância à glicose (ipGTT);

A pressão arterial pulsátil e frequência cardíaca, bem como os reflexos barorreceptor e quimiorreceptor;

O conteúdo hipotalâmico das proteínas/enzimas IR, IRS-1, IRS-2 PI3K, AKT, ObR, JAK, STAT, pSTAT, SOCS, NPY, PEPCK e G6Pase;

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



- ❑ **Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários:** Segundo o autor: Tendo em vista a baixa agressividade do protocolo, com relação a variáveis de desconforto e dor, prevemos uma baixa incidência de dor e sofrimento. Todavia, animais que forem diagnosticados com dor serão prontamente medicados e colocados em observação frequente. Cuidados veterinários serão solicitados e, caso seja tomada decisão conjunta entre pesquisadores e veterinário, o animal será eutanasiado por sobrecarga de anestésico.
- ❑ **Grau de invasividade:** 3
- ❑ **Material utilizado em outros projetos:** Não se aplica.
- ❑ **Método de eutanásia:** Choque hipovolêmico, punção venosa (veia cava inferior) sob anestesia geral.
- ❑ **Destino do animal:** As carcaças serão encaminhadas para incineração

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- ❑ **Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFG:** O protocolo é composto pela Ficha de Protocolo do Projeto (p. 1-16), Termo de responsabilidade do médico veterinário (p. 16), Termo de responsabilidade assinado por todos os pesquisadores (p. 17), Certidão de ata (p. 18), Parecer CEUA (p.19), Termo de atendimento de pendências (p. 25) e CD com os itens do protocolo físico gravados em mídia digital.
- ❑ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Riscos de acidentes com os pesquisadores inerentes a manipulação dos animais, como ataques ou acidentes com perfurocortantes.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **01 de junho de 2019**.

VII - Data da reunião: 10/07/17.

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

REFERÊNCIAS

1. O.M.S. Obesity and overweight. Geneva: World Health Organization.; 2014.
2. Hurt RT, Kulisek C, Buchanan LA, McClave SA. The obesity epidemic: challenges, health initiatives, and implications for gastroenterologists. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* [Internet]. 2010 Dec;6(12):780–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21301632>
3. Vadiveloo M, Scott M, Quatromoni P, Jacques P, Parekh N. Trends in dietary fat and high-fat food intakes from 1991 to 2008 in the Framingham Heart Study participants. *Br J Nutr* [Internet]. 2014 Feb 19;111(04):724–34. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114513002924
4. Martinez JA. Body-weight regulation: causes of obesity. *Proc Nutr Soc* [Internet]. 2000 Aug;59(3):337–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10997649>
5. S.B.C. Atlas corações do Brasil. 2005.
6. Kanarek RB, Hirsch E. Dietary-induced overeating in experimental animals. *Fed Proc* [Internet]. 1977 Feb;36(2):154–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/838081>
7. Stice E, Figlewicz DP, Gosnell BA, Levine AS, Pratt WE. The contribution of brain reward circuits to the obesity epidemic. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2013 Nov;37(9):2047–58. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763412002102>
8. Spencer EH, Frank E, Elon LK, Hertzberg VS, Serdula MK, Galuska DA. Predictors of nutrition counseling behaviors and attitudes in US medical students. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2006 Dec 1;84(3):655–62. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/84/3/655/4648783>
9. O.M.S. Obesity: preventing and managing the global epidemic. 2000.
10. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, et al. Human Epicardial Adipose Tissue Is a Source of Inflammatory Mediators. *Circulation* [Internet]. 2003 Nov 18;108(20):2460–6. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.0000099542.57313.C5>
11. Santos RD, Sociedade Brasileira de Cardiologia. [III Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Guideline of Atherosclerosis Prevention from

- Atherosclerosis Department of Sociedade Brasileira de Cardiologia]. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2001 Nov;77 Suppl 3:1–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781591>
12. Lovren F, Teoh H, Verma S. Obesity and Atherosclerosis: Mechanistic Insights. *Can J Cardiol* [Internet]. 2015 Feb;31(2):177–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0828282X14016213>
 13. Yamazaki T, Komuro I, Shiojima I, Yazaki Y. The renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. *Heart* [Internet]. 1996 Nov 1;76(3 Suppl 3):33–5. Available from: http://heart.bmj.com/cgi/doi/10.1136/hrt.76.3_Suppl_3.33
 14. Shimizu T, Liao JK. Rho Kinases and Cardiac Remodeling. *Circ J* [Internet]. 2016;80(7):1491–8. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/80/7/80_CJ-16-0433/_article
 15. Grace JA, Herath CB, Mak KY, Burrell LM, Angus PW. Update on new aspects of the renin–angiotensin system in liver disease: clinical implications and new therapeutic options. *Clin Sci* [Internet]. 2012 Aug 1;123(4):225–39. Available from: <http://www.clinsci.org/cgi/doi/10.1042/CS20120030>
 16. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Elsevier Saunders, editor. 2012.
 17. Dunn AJ, Swiergiel AH, Beaupaire R de. Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2005 Jan;29(4–5):891–909. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763405000539>
 18. Alavi M, Grebely J, Matthews G V, Petoumenos K, Yeung B, Day C, et al. Effect of pegylated interferon- α -2a treatment on mental health during recent hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2012 May;27(5):957–65. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1746.2011.07035.x>
 19. Udina M, Castellví P, Moreno-España J, Navinés R, Valdés M, Forns X, et al. Interferon-Induced Depression in Chronic Hepatitis C. *J Clin Psychiatry* [Internet]. 2012 Aug 15;73(08):1128–38. Available from: <http://article.psychiatrist.com/?ContentType=START&ID=10008004>
 20. Wichers MC, Kenis G, Koek GH, Robaey G, Nicolson NA, Maes M. Interferon- α -induced depressive symptoms are related to changes in the cytokine network but not to cortisol. *J Psychosom Res* [Internet]. 2007 Feb;62(2):207–14.

- Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022399906004296>
21. Ren J, Pulakat L, Whaley-Connell A, Sowers JR. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Mol Med* [Internet]. 2010 Oct 20;88(10):993–1001. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00109-010-0663-9>
 22. Youn J-Y, Siu KL, Lob HE, Itani H, Harrison DG, Cai H. Role of Vascular Oxidative Stress in Obesity and Metabolic Syndrome. *Diabetes* [Internet]. 2014 Jul 1;63(7):2344–55. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db13-0719>
 23. Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Early life nutrition and metabolic programming. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2010 Nov;1212(1):78–96. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2010.05798.x>
 24. Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. *J Nutr* [Internet]. 2013 May 1;143(5):553–62. Available from: <https://academic.oup.com/jn/article/143/5/553/4574517>
 25. Moreira ASB, Teixeira Teixeira M, da Silveira Osso F, Pereira RO, de Oliveira Silva-Junior G, Garcia de Souza EP, et al. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2009 Dec;19(11):805–10. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939475309000295>
 26. de Souza Rodrigues Cunha AC, Pereira RO, dos Santos Pereira MJ, de Melo Soares V, Martins MR, Teixeira Teixeira M, et al. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion — the role of GLUT-2. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2009 Jun;20(6):435–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286308001101>
 27. Pereira RO, Moreira ASB, de Carvalho L, Moura AS. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts. *Regul Pept* [Internet]. 2006 Sep;136(1–3):117–21. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167011506000772>
 28. Langley-Evans SC. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *J Hum Nutr Diet* [Internet]. 2015 Jan;28:1–14. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jhn.12212>
 29. Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MCF, Trevenzoli IH, da Conceição EPS,

- Bonono IT, et al. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2011 Feb;22(2):109–17. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286310000070>
30. Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* [Internet]. 2007 May;261(5):412–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x>
 31. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* [Internet]. 1991 Oct 26;303(6809):1019–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1954451>
 32. Fante T de, Simino LA, Reginato A, Payolla TB, Vitoréli DCG, Souza M de, et al. Diet-Induced Maternal Obesity Alters Insulin Signalling in Male Mice Offspring Rechallenged with a High-Fat Diet in Adulthood. Aguila MB, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Aug 1;11(8):e0160184. Available from: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0160184>
 33. Portella AK, Silveira PP, Laureano DP, Cardoso S, Bittencourt V, Noschang C, et al. Litter size reduction alters insulin signaling in the ventral tegmental area and influences dopamine-related behaviors in adult rats. *Behav Brain Res* [Internet]. 2015 Feb;278:66–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432814006317>
 34. Plagemann A, Roepke K, Harder T, Brunn M, Harder A, Wittrock-Staar M, et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *J Perinat Med* [Internet]. 2010 Jan 1;38(4). Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/jpme.2010.38.issue-4/jpm.2010.051/jpm.2010.051.xml>
 35. Levine AS, Billington CJ. Opioids as agents of reward-related feeding: a consideration of the evidence. *Physiol Behav* [Internet]. 2004 Aug;82(1):57–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938404001829>
 36. Pecina S. Hedonic Hot Spot in Nucleus Accumbens Shell: Where Do μ -Opioids Cause Increased Hedonic Impact of Sweetness? *J Neurosci* [Internet]. 2005 Dec 14;25(50):11777–86. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2329-05.2005>
 37. Khanh D V., Choi Y-H, Moh SH, Kinyua AW, Kim KW. Leptin and insulin

- signaling in dopaminergic neurons: relationship between energy balance and reward system. *Front Psychol* [Internet]. 2014 Aug 7;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpsyg.2014.00846/abstract>
38. Conceição EPS, Carvalho JC, Manhães AC, Guarda DS, Figueiredo MS, Quitete FT, et al. Effect of Early Overfeeding on Palatable Food Preference and Brain Dopaminergic Reward System at Adulthood: Role of Calcium Supplementation. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 2016 May;28(5). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jne.12380>
 39. Toledo-Rodriguez M, Sandi C. Stress during Adolescence Increases Novelty Seeking and Risk-Taking Behavior in Male and Female Rats. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2011;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2011.00017/abstract>
 40. Chang G-Q, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF. Maternal High-Fat Diet and Fetal Programming: Increased Proliferation of Hypothalamic Peptide-Producing Neurons That Increase Risk for Overeating and Obesity. *J Neurosci* [Internet]. 2008 Nov 12;28(46):12107–19. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2642-08.2008>
 41. de Oliveira JC, Lisboa PC, de Moura EG, Barella LF, Miranda RA, Malta A, et al. Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. *J Endocrinol* [Internet]. 2013 Feb;216(2):195–206. Available from: <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/216/2/195.xml>
 42. Klump KL. Puberty as a critical risk period for eating disorders: A review of human and animal studies. *Horm Behav* [Internet]. 2013 Jul;64(2):399–410. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0018506X13000548>
 43. Moreno Villares JM. Los mil primeros días de vida y la prevención de la enfermedad en el adulto. *Nutr Hosp* [Internet]. 2016 Jul 12; Available from: <http://revista.nutricionhospitalaria.net/index.php/nh/article/view/337>
 44. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2011 Jun;32(3):159–221. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009829971100032X>
 45. Bales CW, Kraus WE. Caloric Restriction: implications for human cardiometabolic health. *J Cardiopulm Rehabil Prev* [Internet]. 2013;33(4):201–

8. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=01273116-201307000-00001>
46. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* [Internet]. 1985 Aug;14(3):149–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2864480>
47. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* [Internet]. 1934;18(3):385–403. Available from: <http://content.apa.org/journals/com/18/3/385>
48. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* [Internet]. 1977 Oct;229(2):327–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/596982>
49. Srinivasan M, Mahmood S, Patel MS. Metabolic programming effects initiated in the suckling period predisposing for adult-onset obesity cannot be reversed by calorie restriction. *Am J Physiol Metab* [Internet]. 2013 Mar;304(5):E486–94. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00519.2012>
50. de Oliveira JC, de Moura EG, Miranda RA, de Moraes AMP, Barella LF, da Conceição EPS, et al. Low-protein diet in puberty impairs testosterone output and energy metabolism in male rats. *J Endocrinol* [Internet]. 2018 Jun;237(3):243–54. Available from: <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/237/3/JOE-17-0606.xml>
51. Weber KT. Targeting pathological remodeling: concepts of cardioprotection and reparation. *Circulation* [Internet]. 2000 Sep 19;102(12):1342–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10993849>
52. SWYNGHEDAUW B. Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. *Physiol Rev* [Internet]. 1999 Jan;79(1):215–62. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1999.79.1.215>
53. Yim HE, Ha KS, Bae IS, Yoo KH, Hong YS, Lee JW. Overweight, hypertension and renal dysfunction in adulthood of neonatally overfed rats. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2013 Jul;24(7):1324–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286312002847>
54. Chu NF, Spiegelman D, Hotamisligil GS, Rifai N, Stampfer M, Rimm EB.

- Plasma insulin, leptin, and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and thrombogenic cardiovascular disease risk factors among men. *Atherosclerosis* [Internet]. 2001 Aug;157(2):495–503. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11472752>
55. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* [Internet]. 1995 May 1;95(5):2409–15. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/117936>
 56. Capuron L, Ravaud A, Gualde N, Bosmans E, Dantzer R, Maes M, et al. Association between immune activation and early depressive symptoms in cancer patients treated with interleukin-2-based therapy. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 2001 Nov;26(8):797–808. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585680>
 57. Capuron L, Ravaud A, Neveu PJ, Miller AH, Maes M, Dantzer R. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2002 Jun 18;7(5):468–73. Available from: <http://www.nature.com/articles/4000995>
 58. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2009 May;65(9):732–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322308015321>
 59. Raison CL, Miller AH. Malaise, melancholia and madness: The evolutionary legacy of an inflammatory bias. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2013 Jul;31:1–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159113001773>
 60. Cho SJ, Lee HJ, Rhee SJ, Kim EY, Kim K-N, Yoon DH, et al. The relationship between visceral adiposity and depressive symptoms in the general Korean population. *J Affect Disord* [Internet]. 2019 Feb;244:54–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165032717319249>
 61. Bayandor P, Farajdokht F, Mohaddes G, Diba R, Hosseindoost M, Mehri K, et al. The effect of troxerutin on anxiety- and depressive-like behaviours in the offspring of high-fat diet fed dams. *Arch Physiol Biochem* [Internet]. 2018 Feb 26;1–7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13813455.2018.1443142>

62. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The Effect of Retarded Growth Upon the Length of Life Span and Upon the Ultimate Body Size. *J Nutr* [Internet]. 1935 Jul 1;10(1):63–79. Available from: <https://academic.oup.com/jn/article/10/1/63/4725662>