



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA
CLÍNICA E EXPERIMENTAL - CLINEX

Mario José dos Santos Pereira

**Associação de POMC, NPY e IRS2
hipotalâmicos com padrões de
comportamento alimentar em ratos
Wistar normais e sobrepeso**

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Mario José dos Santos Pereira

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, do Centro Biomédico da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Aníbal Sanchez Moura
Co-orientador : Prof. Frank Tenório.

Rio de Janeiro
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Mario José dos Santos

Associação de POMC, NPY e IRS2 hipotalâmicos com padrões de comportamento alimentar em ratos *wistar* normais e sobrepeso. / Mario José dos Santos Pereira – 2009.

xiii, 68p, il.

Orientador: Aníbal Sanchez Moura; Frank Tenório.

Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas, Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental (CLINEX).

1. programação metabólica 2. hipotálamo 3. obesidade 4. comportamento alimentar 5. ritmo circadiano 6. hiperfagia 7. neuropeptídeo Y 8. receptor de insulina substrato 2 9. pró-ópiomelanocortina. I – Moura, Aníbal Sanchez II – Tenório, Frank III – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental IV. Título

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.



Rio de Janeiro, 25 de maio de 2009

Mario José dos Santos Pereira

**Associação de POMC, NPY e IRS2 hipotalâmicos
com padrões de comportamento alimentar em ratos
wistar normais e sobrepeso.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, do Centro Biomédico da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Doutor em Ciências, na área de Fisiopatologia.

Aprovada com grau máximo, em 25/5/2009 pela BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura
UERJ – IBRAG – Dep. de Ciências Fisiológicas

Profa. Dra. Maria Inês Nogueira
USP – ICB – Dep. de Anatomia

Profa. Dra. Aline da Rocha Gesualdi
CEFET-RJ - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica

Profa. Yael Abreu Villaça
UERJ – IBRAG – Dep. de Ciências Fisiológicas

Profa. Penha Cristina Barradas Daltro-Santos (UERJ)
UERJ – IBRAG – Dep. de Farmacologia e Psicobiologia

Rio de Janeiro
2009

Dedicatória

À minha filha Laura, e seus abraços reconfortantes,
E aos Técnico Administrativos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sempre
presentes nos bastidores desta casa.

Agradecimentos.

À minha esposa e filha, por perdoarem as horas que fiquei devendo.

Ao meu irmão Edu, que, apesar de tricolor, sempre apostou em mim.

À minha irmã Valéria, pela paciência ao ouvir meus desabafos.

Ao meu orientador e amigo Aníbal Sanchez Moura, pelo exemplo de pessoa.

Ao prof. Frank Tenório e pessoal do laboratório de Neurobiologia, do depto. de Farmacologia e Psicobiologia, pelas dicas e uso do criostato.

Ao prof. Alex Christian Manhães, à Andrea e ao pessoal do laboratório de Neurofisiologia, do depto de Ciências Fisiológicas, pelas dicas e uso do criostato.

Ao amigo Martinho Cardoso Jr., pela motivação para cumprir este compromisso.

Ao prof. Adilson Elias Xavier, pela orientação e disponibilidade amiga.

À profa. Aline da Rocha Gesualdi, pela ajuda com a modelagem dos dados.

Ao amigo Heliomar, pelas dicas da histologia.

À todo o pessoal do LFND, pelo carinho e amizade do dia-a-dia, e em especial,

À Helena da Cruz Mezzomo, pelos ensinamentos.

À Erica Patrícia Garcia de Souza, pelas dicas e por tolerar minha bagunça.

À Alessandra Cordeiro de Souza, pela força com os ratos, e motivação.

À Paula Paraguassú Brandão, pela amizade e paciência.

Às ICs, Fabiana, Raquel, e Natalia, pela análise dos vídeos e ajuda na imunomarcção.

À Deus, por ter me dado saúde e disposição, para enfrentar mais esta etapa na minha vida.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Dados biométricos e taxas hormonais plasmáticas	41
Tabela 2	Consumo de ração absoluto e ponderado pelo índice de Lee	41
Tabela 3	Estatística descritiva e teste F da regressão senoidal	42
Tabela 4	Dados de área % ocupada por imunomarcção de POMC	44
Tabela 5	Dados de área % ocupada por imunomarcção de NPY	45
Tabela 6	Dados de área % ocupada por imunomarcção de IRS2	45

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema da citoarquitetura do núcleo arqueado	18
Figura 2	Esquema de integração dos neurônios anabólicos e catabólicos no núcleo arqueado	19
Figura 3	Esquema de obtenção dos animais sobrepeso por redução de ninhada	28
Figura 4	Gaiolas com janela de vidro usadas para o confinamento dos animais durante a gravação dos experimentos	29
Figura 5	Gráfico gerados pelo software Sound Forge, a partir de um arquivo de som em formato MP3 com detalhe da marcação de eventos	31
Figura 6	Gráfico gerados pelo software Sound Forge, de 5 réplicas alinhadas para a determinação do estado de fome-saciedade de um animal	33
Figura 7	Demonstração da sequência de procedimentos usados na análise das lâminas imunomarcadas	39
Figura 8	Gráficos Box-Wiskar com os dados da frequência, duração e intervalo entre as refeições.....	42
Figura 9	Gráfico com a frequência de inícios de refeições relacionados com as respectivas durações dos eventos e gráfico da regressão senoidal derivada	43
Figura 10	Gráficos Box-wiskar com os dados de área relativa ocupada por neurônios POMC (A), NPY (B) e IRS2 (C) imunomarcados no núcleo arqueado.	46
Figura 11	Campos microscópicos da imunohistoquímica do neuroreceptor POMC no núcleo arqueado	47
Figura 12	Campos microscópicos da imunohistoquímica do neuroreceptor NPY no núcleo arqueado	48
Figura 13	Campos microscópicos da imunohistoquímica do substrato IRS2 no núcleo arqueado	49

Lista de Siglas e Abreviaturas

% - Por cento.

°C – Graus Celsius.

µL – microlitro.

µm – micrometro.

1000x – Aumento de 1000 vezes.

AgRP – Peptídeo relacionado ao gene Agouti.

ARC – Núcleo arqueado.

Best Fit – Ajuste ideal encontrado pela função de regressão.

bits – Concatenação dos termos Binary Unit. Uma unidade de informação.

C – Grupo controle.

cm – centímetro.

CART – Fator de Transcrição regulado por anfetaminas e cocaína.

CF – Animais do grupo controle sacrificados em estado de fome.

clock gen – Gen cuja expressão está associada à algum ritmo biológico.

CS – Animais do grupo controle sacrificados em estado de saciedade.

DAB – Diaminobenzidina.

dL – Decilitro.

DMH – Hipotálamo dorsomedial.

DPN – Dia pós-nascimento.

EP – Erro padrão.

Fr – Fim de uma refeição

FAA – Atividade motora antecipatória às refeições.

g – grama.

Gb – Gygabyte. – Unidade de informação.

h – Hora.

HRP – Enzima Horseradish Peroxidase.

Ir – Início de uma refeição.

IC – Intervalo de Confiança.

IRS2 – Receptor de Insulina substrato 2.

JAK2 - Janus quinase 2.

KHz – Kiloherztz.

LHA – Zona lateral hipotalâmica.

Mr – Meio de uma refeição.

M – Molar.

min. – Minuto.

mL – Mililitro.

MP3 – MPEG 3 – formato de compactação de arquivos de som.

Mpixels – Megapixels.

NaCl – Cloreto de Sódio.

ng – nanograma.

NGS – Soro anti-cabra.

NPY – Neuropeptídeo Y.

Or – Outros comportamentos, nos quais o animal não estava se alimentando.

Ob-R_b - Isoforma longa do receptor de leptina.

PBS – Tampão fosfato.

pH – Potencial de Hidrogênio.

POMC – Pró-ópiomelanocortina.

PVN – Núcleo paraventricular.

RAM – Random Access Memory.

R_c – Momento do começo de uma refeição.

R_f – Momento do fim de uma refeição.

R_m – Momento do meio de uma refeição.

RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro.

R_o – Momento de outros comportamentos, não associados à uma refeição.

rpm – Rotações por minuto.

S – Grupo sobrepeso.

SCN – Núcleo supraquiasmático.

SF – Animais do grupo sobrepeso sacrificados em estado de fome.

SNC – Sistema nervoso central.

SS – Animais do grupo sobrepeso sacrificados em estado de saciedade.

STAT3 - fator de transdução e ativação de transcrição 3.

μUI – micro Unidade Internacional.

VMH – Hipotálamo ventromedial.

Resumo

O comportamento alimentar de uma espécie é determinado por um conjunto de características filogenéticas, ontogenéticas, e epigenéticas, e regulado por fatores internos e externos ao organismo. Os fenômenos naturais que regem a vida no nosso planeta são periódicos em sua maioria, e a oferta de alimentos não é exceção. Cada safra é seguida de uma entressafra, e este ritmo sincroniza diversos outros ritmos, exógenos e endógenos, capazes de determinar a sobrevivência de espécies. Uma das estratégias adaptativas mais primitivas e bem sucedidas na dinâmica oscilatória da natureza, é o acúmulo de reservas. Nossa espécie, nos últimos 50 anos, vive uma situação de grande oferta de alimentos, período este extremamente pequeno, se visto sob a ordem de grandeza da evolução humana. Este fenômeno tem sido determinante na prevalência do depósito de energia e em decorrência, do surgimento da obesidade e suas conseqüentes patologias. O hipotálamo está intimamente associado à homeostase energética e ao comportamento alimentar. No núcleo arqueado hipotalâmico encontram-se populações neuronais orexigênicas e anorexigênicas, dentre as quais, as que expressam os neuroreceptores POMC, NPY e o substrato de receptor de insulina IRS2. A modificação da expressão destas proteínas tem sido associada à alterações do comportamento alimentar, bem como à impressão e programação metabólica, capazes de induzir obesidade em ratos adultos. A correlação desta circuitaria neuronal com o comportamento alimentar, porém, ainda não está suficientemente compreendida. A detecção do estado de fome-saciedade nos ratos, fundamental no estudo da neurofisiologia relacionada ao comportamento alimentar, vem sendo obtida via de regra, por meio de procedimentos complexos de observação comportamental. O presente estudo contribui para o conhecimento de padrões de alimentação determinados por condições nutricionais, e sua relação com a expressão neurofisiológica hipotalâmica dos neurônios POMC, NPY e IRS2. Utilizando o modelo de programação metabólica de Plagemann (1999) obtivemos animais com 25% de sobrepeso em relação aos animais controle, hiperfágicos, e com padrões de tamanho e ritmo circadiano de refeição, distintos. Apesar dos níveis hormonais elevados de leptina ($>100\%$, $p<0,001$) e insulina ($>90\%$, $p<0,05$) em relação ao grupo controle, estes animais apresentaram baixa expressão no estado de fome, e alta expressão, na saciedade, de NPY hipotalâmico, sugerindo que o POMC estaria mais comprometido, a longo prazo, com a regulação do ritmo alimentar. A hiperinsulinemia e hiperleptinemia plasmática associada à reduzida expressão de POMC e IRS2 no ARC, corroboraram esta conclusão. Demonstramos também padrões de alimentação distintos. O método de registro da alimentação, baseado no som da roída foi validado como excelente, pelos registros obtidos nos vídeos, e mostrou-se eficiente. Quando os estados de fome-saciedade foram discriminados nos grupos controle e sobrepeso, os resultados da expressão hipotalâmica dos neuroreceptores estudados se mostraram associados aos particulares padrões de alimentação.

Palavras-chave: programação metabólica, hipotálamo, obesidade, hiperfagia, neuropeptídeo Y, receptor de insulina substrato 2, pró-ópiomelanocortina, comportamento alimentar, ritmo circadiano.

Abstract

The feeding behavior of a specie is determined by a group of phylogenetic, ontogenetic, and epigenetic features, and regulated by internal and external factors to the organism. The natural phenomena that govern life in our planet are mainly periodic, and the food stocks is not an exception. Each harvest is followed by a time between harvests, and this rhythm synchronizes other several exogenous and endogenous rhythms, capable of determining the survival of species. One of the most primitive strategies of adaptative evolution of species, and what usually happens regarding the oscillatory dynamics of nature, is the reserve accumulation. Our species, in the last 50 years, has been living a situation of great food offer, such period is extremely small if analysed under the greatness order of the human evolution. This phenomenon has been decisive in the prevalence of the energy deposit and, in consequence, determining the appearance of obesity and its consequent pathologies. The hypothalamus is intimately associated to the energy homeostasis and the feeding behavior. In the arcuate nucleus are orexigenic and anorexigenic neuronal populations, that express the neuroreceptors POMC, NPY and insulin receptor substratum IRS2. The modification of these proteins expression, has been associated to alterations of the feeding behavior, as well as to the metabolic imprinting and programming, capable to induce obesity in adult rats. The correlation of this neuronal circuits with the alimentary behavior, however, it is not yet sufficiently understood. The detection of the hunger-satiation state in the rat, crucial in the neurophysiology studies related to the alimentary behavior, has been obtained through complex procedures of behavioral observation. The present study contributed to the knowledge of certain feeding patterns for nutritional conditions, and its relationship with the neurophysiological expression of POMC, NPY and IRS2 neurons. Using the metabolic programming model of Plagemann (1999) animals with 25% of overweight in relation to the control animals were obtained, hyperphagics, and with different size patterns and meal circadian rhythm. In spite of the high hormonal levels of leptin (>100%, $p < 0,001$) and insulin (>90%, $p < 0,05$) in relation to the control groups, these animals presented low expression in the hunger state, and high expression in the satiation of hypothalamic NPY, suggesting that POMC would be more committed, in the long term, with the regulation of the feeding rhythm. The hyperinsulinemia and plasmatic hyperleptinemia associated to the reduced POMC and IRS2 expression in the ARC, corroborated this conclusion. We also demonstrated different feeding patterns. The feeding registration method, based on the gnaw sound was validated as excellent, when compared to a gold pattern, the registrations obtained in the videos, and it were considered efficient. When the hunger-satiation states were discriminated in the control and overweight groups, the results of the hypothalamic neuroreceptors expression studied showed association to the feeding patterns.

Key Words: metabolic programming, hypothalamus, obesity, hyperphagia, neuropeptide Y, insulin-receptor substratum 2, pro- α -melanocortin, feeding behavior, circadian rhythm

Sumário

Lista de Tabelas	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Siglas e Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Abstract	xii
Introdução.....	14
Objetivo	
Geral	26
Específicos	26
Material e Métodos	
Impressão Metabólica	27
Seleção e Pareamento dos Espécimes	28
Mensuração do consumo de ração	28
Registro do comportamento alimentar – método visual	29
Registro do comportamento alimentar – método sonoro	30
Determinação do estado de fome e saciedade dos animais	32
Comparação entre o ritmo alimentar dos dois grupos	33
Análise do perfil dos animais	34
Fixação do cérebro por perfusão transcardíaca	34
Preparação das lamínas para a imunohistoquímica do hipotálamo.....	35
Análise dos cortes histológicos	37
Análise estatística	40
Resultados	
Perfil biométrico e metabólico dos animais	41
Consumo de Ração	41
Comportamento Alimentar.....	42
Validação do Método Sonoro.....	44
Imunohistoquímica.....	44
Discussão	50
Conclusões	57
Referências bibliográficas	58
Anexo I – Ficha de Registro do Experimento XLV	68

Introdução

Cada espécie evolui no sentido de explorar com eficiência seu nicho ecológico, obtendo a energia necessária para sua sobrevivência, com o menor esforço possível. Indivíduos são selecionados para contribuir com o genoma de uma população quando, por mudanças ambientais relativamente bruscas, superam seus desafios com mais eficiência. Uma floração em época diferente, uma praga que provoca a redução da oferta de alimento, o surgimento de um novo competidor ou predador, são tipos de situações que podem evidenciar estratégias adaptativas.

O comportamento alimentar e nutricional de uma espécie, é exemplo desta adaptação, que por sua vez é determinada por um conjunto de características filogenéticas, ontogenéticas, e epigenéticas, e regulada por fatores internos e externos aos organismos. Sabor dos alimentos, teor nutritivo, temperatura, crenças sociais, são alguns dos fatores compreendidos como externos. Os fatores internos incluem os neurotransmissores, os hormônios, a formação de metabólitos, os sistemas de reserva e receptores sensoriais. Este complexo de centros nervosos e vias metabólicas atua, em algumas situações, como catalisador, em outras, como inibidor, procurando adaptar o organismo às suas necessidades energéticas diante de alterações do meio ambiente. A ação de alguns destes sistemas reguladores é refletida em mudanças abruptas no comportamento alimentar e nutricional, que podem ou não se tornar crônicas, em função da manutenção das condições ambientais, ou alterações mais profundas no próprio organismo.

Nossa espécie, nos últimos 50 anos vive uma situação de grande oferta de alimentos. É um fenômeno extremamente recente, se visto sob a perspectiva da evolução humana. Sempre convivemos com uma oferta de nutrientes bem abaixo do que temos hoje. A industrialização dos alimentos dispôs nas prateleiras dos supermercados, uma enorme e sedutora variedade de sabores e texturas, colocando à prova a capacidade dos nossos sistemas reguladores, em nos manter equilibrados.

Uma estratégia adaptativa a novas situações ambientais, primitiva e muito bem sucedida, visto que é adotada por diversos filos do reino animal e vegetal, é o acúmulo de reservas. Quando exposto à algum tipo de stress o

organismo, antevendo situações futuras, acumula reservas energéticas. O excesso de oferta de alimentos, também é um sinalizador para este acúmulo. Nosso planeta impõe ritmos sazonais à maioria das espécies, principalmente com relação à estoques de alimentos. Alterações em florações, provocadas por mudanças climáticas, por exemplo, geram mudanças no consumo de pastagem, pois as espécies precisam acumular energia para sobreviver ao período de entressafra. Mesmo os animais onívoros, ou com dieta variada, são sensibilizados, direta ou indiretamente, por este tipo de variação, que sempre atua de modo sistêmico. No nosso caso, parece que interpretamos os “novos tempos” como um pico de oferta de alimentos, que nos induz ao acúmulo de reservas. Porém nosso estágio evolutivo, formado nos últimos milhões de anos, ainda não nos permite interpretar de modo correto, este novo ritmo, sem entressafras, nos levando, em última conseqüência, ao desequilíbrio do balanço energético. O indivíduo bem sucedido de outrora, capaz de acumular mais reservas, hoje está exposto a uma série de patologias derivadas da obesidade.

Pompeu (1999) discute a inferioridade social e existencial, causada pela frustração dos indivíduos em não alcançarem os padrões estéticos impostos, o que certamente funciona como fator de seleção natural para possíveis características genéticas associadas à obesidade.

Assim, a casualidade e o tratamento da obesidade são multidimensionais, visando tanto o aumento do gasto energético, quanto o equilíbrio qualitativo e quantitativo da dieta alimentar, de acordo com as características do indivíduo, como biótipo, atividades, etc, sendo que a prevenção da obesidade depende da promoção de uma vida saudável, que integre estas dimensões (Sichieri et al., 2000).

Os órgãos de saúde pública, independente das condições econômicas dos seus países, tem desenvolvido guias para prevenir doenças metabólicas e cardiovasculares, e em todos, o controle da alimentação é um dos pilares (NIH, 2004). Neste aspecto, o estudo do comportamento alimentar e nutricional ganha importância sem precedente na história da humanidade.

O crescente estudo de hormônios reguladores do metabolismo energético nos últimos anos, reflete a importância que a ciência tem dado à esta perspectiva (Ahima & Antwi, 2008; Bouret & Simerly, 2007; Flier, 2006;

Flier, 2004). O presente estudo associa ritmos circadianos da alimentação com a expressão neurofisiológica de alguns receptores hormonais.

Sabemos que a regulação do apetite é um processo complexo, que envolve percepção central e periférica, e vias de transmissão de naturezas diversas (Kurose et al, 2005). As vias neuronais que participam deste processo podem ser sinalizadas por diversas proteínas, tanto no aumento quanto na redução da fome (Chapman et al., 1998), e o hipotálamo é um centro integrador da ação dos nutrientes através de suas ligações com a região da ínsula (Poulin & Timofeeva, 2008; Oomura et al., 2006), e também modula o processo de fome-saciedade através de neuroreceptores e hormônios do sistema digestório (Obici et al., 2002; Porte et al., 2002; Wilding, 2002; Erlanson-Albertsson, 2005).

Os neuroreceptores hipotalâmicos que participam da regulação do apetite são classificados em dois grandes grupos: *Orexigênicos*, quando estão associados ao estímulo da ingestão alimentar, e *Anorexigênicos*, associados à inibição do apetite. Eles participam da sinalização e manutenção da homeostase energética, e estão relacionados com a circuitaria neuronal atuante na modulação do comportamento alimentar em curto e longo prazos (Flier & Maratos-Flier, 1998; Friedman & Halaas, 1998; Elmquist et al., 1999; Hols & Schwartz, 2004).

Foi demonstrado recentemente que os hormônios do sistema digestório integram a complexa rede de sinais de fome, com a participação da grelina e da galanina, e de sinais de saciedade, com a participação da colecistoquinina (CCK), peptídeo similar ao glucagon-1 (GLP-1), oxintomodulina e enterostatina, que são liberados em resposta à ingestão alimentar, além de controlarem a duração da refeição. Alguns autores afirmam que os sinais de saciedade atuam inibindo a expressão de sinais de fome (Thim et al., 1998; Harrold, 2004; Erlanson-Albertson, 2005). O fato de alguns destes hormônios estarem associados a eventos de curta duração, como uma refeição, nos leva a crer que sua expressão, seja no hipotálamo ou em tecidos do sistema digestório, ocorra em momentos críticos, dependentes do estado metabólico do organismo estudado, portanto, a definição precisa do estado de fome-saciedade de um organismo se faz necessária, quando se deseja estudar o efeito de

determinadas alterações de hormônios gastrointestinais, ou neuroreceptores associados.

Estudos iniciais sobre o hipotálamo, envolvendo estímulos e lesões de diversas áreas, fundamentaram sua importância nos processos envolvidos na ingestão alimentar e balanço energético dos organismos superiores (Kennedy, 1950). A princípio supôs-se que o controle alimentar estava organizado em centros específicos da fome e da saciedade, mas considera-se hoje que circuitos neurais mais complexos gerem respostas a estímulos integrados por conexões aferentes, neurais ou humorais, relacionadas a diversas informações endógenas e ambientais. (Woods et al., 1998; Williams et al., 2001).

O hipotálamo está situado na base do cérebro, ao redor do terceiro ventrículo, no centro do diencefalo. Liga o sistema nervoso central ao sistema endócrino, e está relacionado com diversas funções autônomas e comportamentos vitais à sobrevivência dos mamíferos, como a atividade sexual, o comportamento de fuga e caça, a temperatura corporal, a sede a fome e a saciedade, além de regular e sincronizar diversos relógios biológicos. É formado por mais de 40 núcleos, sendo o núcleo arqueado (**ARC**) um dos mais associados à homeostase energética (Berthoud, 2002; Murphy & Bloom, 2004). O núcleo supraquiasmático, principal responsável pelo controle dos ritmos circadianos nos mamíferos, situa-se também próximo ao terceiro ventrículo, em posição imediatamente anterior ao **ARC** e se comunica com ele por vias axonais (Bhumbra et al., 2005; Yi et al, 2006), caracterizando a importância da relação funcional destes dois centros hipotalâmicos (figura 1)

O **ARC** envolve parte da base do terceiro ventrículo, apresentando neurônios nos dois hemisférios cerebrais. No hipotálamo, a barreira hematoencefálica que circunda os capilares é fenestrada, o que permite a passagem de hormônios e neurotransmissores presentes na circulação sanguínea e no liquor encefálico.

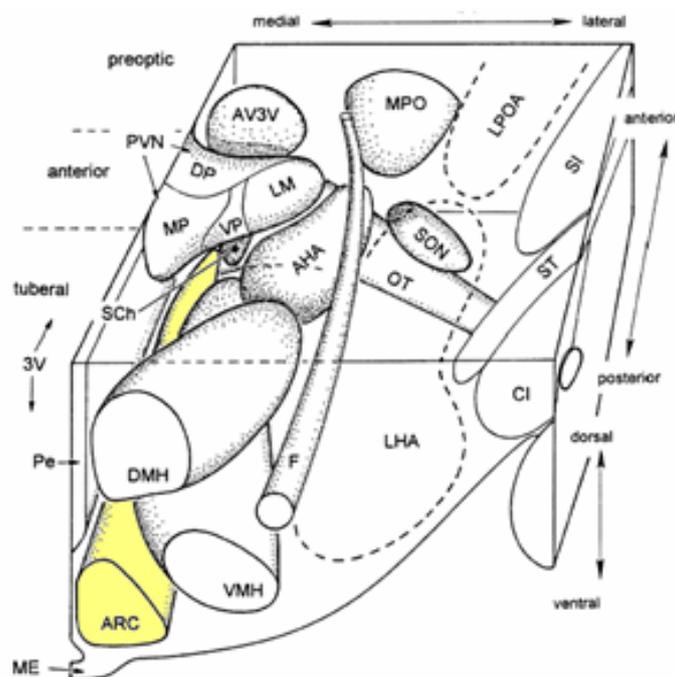


Figura 1 – Esquema da citoarquitetura do núcleo arqueado, com a distribuição espacial de alguns dos seus quarenta núcleos. O núcleo arqueado (**ARC**) encontra-se no canto inferior esquerdo, margeando o terceiro ventrículo (**3V**). A zona lateral hipotalâmica (**LHA**) está delimitada por uma linha tracejada, e o núcleo paraventricular (**PVN**) encontra-se no canto superior esquerdo. Na extremidade superior no **ARC**, podemos ver uma parte do núcleo supraquiasmático (**SCn**). (fonte: Berthoud et al., 2002)

Os circuitos alimentares neuronais no rato desenvolvem-se durante a vida neonatal, porém permanecem estrutural e funcionalmente imaturos até a terceira semana de vida (Bouret & Simerly, 2007). As projeções do ARC para o hipotálamo dorsomedial estão estabelecidas entre o 5º e o 6º dia pós-nascimento (DPN) e a maturação é alcançada por volta do 12º dia. A projeção do ARC para o núcleo paraventricular (PVN) acontece relativamente tarde, em torno do 9º DPN, e as projeções para o hipotálamo lateral parecem se estabelecer no 12º DPN e maturar no 16º DPN (Bouret et al, 2004)

Podemos distinguir duas populações primárias de neurônios no ARC, envolvidas na integração de sinais do estado nutricional (Elias et al., 1998). Neurônios anabólicos, que, quando ativados, promovem o aumento da ingestão alimentar, a diminuição do gasto, e a conseqüente estocagem energética. Esses neurônios co-expressam os neuropeptídeos orexigênicos: NPY e AgRP (Broberger et al., 1998), e são inibidos na medida em que os níveis de leptina e insulina se elevam. A ativação dos neurônios catabólicos

libera os neuropeptídeos anorexigênicos POMC e CART (Elias et al., 1998; Elias et al., 1999), que também são sensíveis à oscilações da concentração de leptina e insulina (Niswender et al., 2004; figura 2).

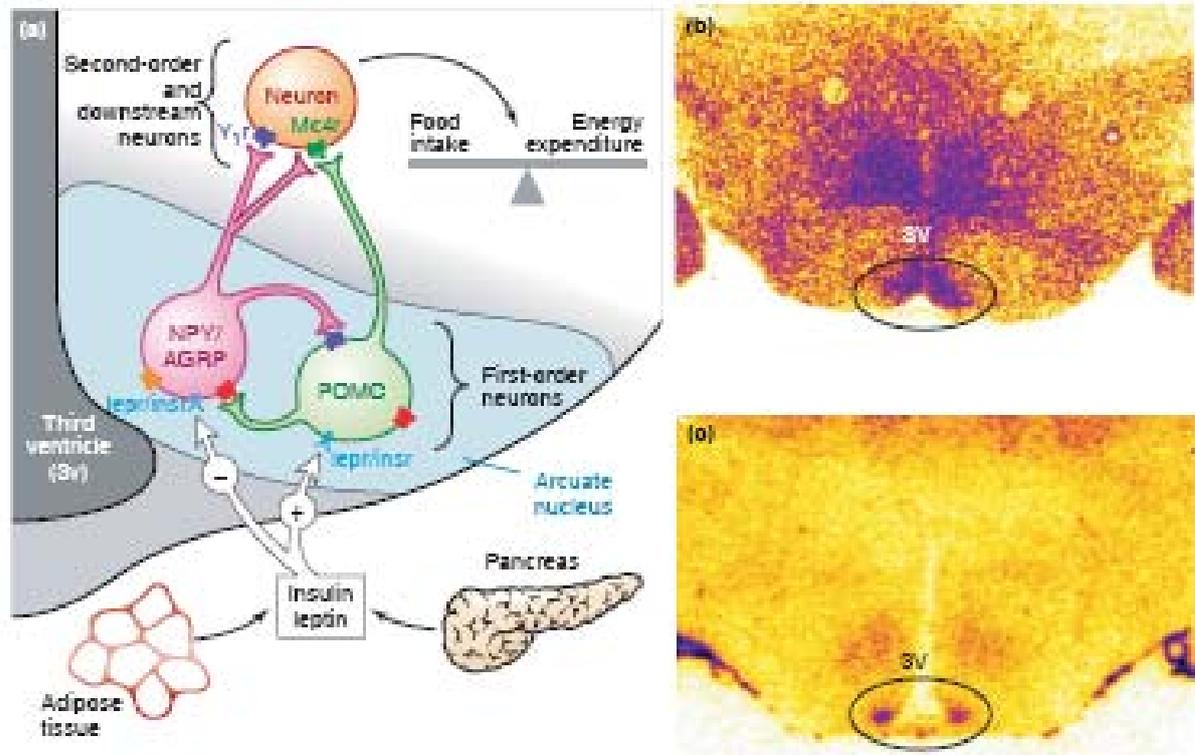


Figura 2 – Esquema de integração funcional de neurônios anabólicos e catabólicos na regulação da homeostase energética, e respectiva expressão dos neuropeptídeos no núcleo arqueado (fonte: Niswender et al., 2004).

Dessa forma, supõe-se que quando os neurônios NPY/AgRP são inibidos, os neurônios POMC/CART são ativados (Grove & Smith, 2003), mediando a ação da insulina e da leptina no hipotálamo (Barker, 1995; Fisher et al., 1999; Meister, 2000; Bjorbaek et al., 1997; Proulx et al., 2002; Pinto et al., 2004; Coppari et al., 2005; Munzberg & Myers, 2005). Estes estímulos gerariam respostas complexas, reguladas por projeções neuronais que também integrariam sinais periféricos do processo fome-saciedade (Baskin et al., 1999; Wauters et al., 2000; Benoit et al., 2002; Smith & Grove, 2002; Grove & Smith, 2003; Niswender et al., 2004; Pinto et al., 2004; Kurose et al., 2005).

Em relação aos hormônios, sabemos que a leptina, produto do gene *obese (ob)* expresso principalmente pelo tecido adiposo (Zhang et al., 1994), envolve-se diretamente com o controle do processo de fome-saciedade. A concentração de leptina circulante no sangue é diretamente proporcional aos

estoques de gordura (Maffei et al., 1995, Considine et al., 1996) e reflete tanto os estoques energéticos quanto a ingestão alimentar (Ahima et al., 1998; Remmers et al., 2008). Por exemplo, a injeção encefálica e humoral de leptina, induziu a redução na ingestão alimentar e aumento no gasto energético em camundongos nocaute para o gene *ob* (*ob/ob*), normalmente obesos e hiperfágicos, comprovando o papel deste hormônio na homeostase energética (Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Friedman & Halaas, 1998; Wynne et al., 2005). Outros estudos demonstraram que uma replicação deficiente do gene *ob* também pode afetar o peso corporal (Coleman, 1978; Wynne et al., 2005). Ainda, a restrição alimentar induzida por alguns dias, provoca supressão dos níveis de leptina sérica, que voltam ao normal com a normalização da dieta (Maffei et al., 1995), pela administração de insulina exógena (Saladin et al., 1995) ou de leptina (Ahima et al., 1998).

A leptina possui receptor transmembrânico específico (Tartaglia et al., 1995) e apresenta múltiplas isoformas (Tartaglia, 1997). A isoforma Ob-Rb apresenta um longo domínio intracelular, onde se ligam as proteínas JAK2 (Janus quinase 2) (Lee et al., 1996) e STAT3 (fator de transdução e ativação de transcrição 3) (Vaisse et al., 1996), estabelecendo assim a ativação da via JAK/STAT (Wilding, 2002).

O receptor Ob-Rb é primariamente expresso no hipotálamo, em particular no ARC, mas também no PVN, no hipotálamo ventromedial (VMH), DMH e LHA (Elmqvist et al., 1999, Wilding, 2002). No ARC, o RNAm de Ob-Rb é expresso por neurônios NPY/AgRP (Mercer et al., 1996) e pelos neurônios POMC (Cheung et al., 1997). Segundo alguns autores, os neurônios orexigênicos NPY/AgRP são inibidos pela leptina e ativados em menores concentrações desta proteína (Schwartz et al., 1996; Elias et al., 1999). É sabido também que a leptina ativa neurônios anorexigênicos, como o POMC (Cowley et al., 2001).

Foi demonstrado que roedores em jejum e camundongos *ob/ob*, ambos caracterizados por redução de leptina sérica, apresentam RNAm de POMC hipotalâmico reduzido, que pode ser normalizado pela administração de leptina exógena (Mizuno et al., 1998). Como inibidora da expressão de neurônios orexigênicos, provoca aumento de RNAm de NPY e AgRP hipotalâmicos nestes mesmos animais (Ahima et al., 1996; Balthasar et al., 2004).

Também a insulina, que é classicamente reconhecida pelo seu papel no controle glicídico e da homeostase energética, bem como a leptina, tem níveis proporcionais à quantidade de gordura corporal total no organismo (Porte et al., 2002).

Vários estudos tem indicado o hiperinsulinemismo perinatal da prole de mães diabéticas durante a gestação, como indutor da desorganização permanente dos núcleos hipotalâmicos, gerando animais com sobrepeso e susceptibilidade aumentada ao diabetes melitus quando adultos (Gamallo et al., 1989; Rohner-Jeanreneud & Jeanrenaud, 1997; Plagemann et al., 1998a; Plagemann et al., 1998b; Harder et al., 1999). Desta forma, níveis anormais de insulina ou leptina em períodos críticos do desenvolvimento podem causar anomalias no desenvolvimento das projeções neuronais hipotalâmicas, provocando, a longo prazo, desequilíbrios na regulação da homeostase energética (Grove & Smith, 2003)

Harder e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento exógeno com insulina, diariamente, do 8º. ao 11º. DPN em ratos, leva à síndrome metabólica persistente na vida adulta, comprovando que a hiperinsulinemia pode influenciar à longo prazo, o peso corporal.

Wynne e colaboradores (2005) demonstraram o papel da insulina no controle endógeno do apetite, associando o aumento da insulina circulante com a hipoglicemia e com o aumento da ingestão alimentar. No SNC, a insulina atua como sinal anorexigênico. A injeção intraventricular de insulina em roedores, resulta em diminuição da ingestão alimentar e causa diminuição no peso corporal, se administrada por períodos superiores à uma semana (Ikeda et al., 1986). Injeções de insulina no PVN também provocam o mesmo efeito (Wynne et al., 2005)

Modificações da expressão dos neurônios hipotalâmicos POMC e NPY no ARC tem sido associadas a alterações do comportamento e consumo alimentar em ratos, e vem despertando o interesse em estudos dessa natureza (Valassi et al., 2008; Dziedzic et al., 2007; Higuchi et al., 2008; Sanchez et al., 2008; Wang et al., 2008).

Contudo, a associação da estrutura hipotalâmica com o comportamento alimentar continua a ser pouco entendida. A detecção do estado de fome-saciedade em animais como ratos, não é tarefa trivial, e vem sendo obtida via

de regra, por meio de procedimentos complexos de observação comportamental. Baseiam-se em diferentes sensores, que em última análise, medem a “intenção” do animal se alimentar, ou o ato da alimentação propriamente dito. Gaiolas de esteira, células de força no piso da gaiola, sensores infravermelhos registrando o acesso do animal ao comedouro, câmeras de vídeo, e até radiotransmissores intraperitoneais são usados (Landry & Mistlberger, 2007). Esses métodos de registro alimentar baseiam-se na reprodução dos ritmos circadianos dos animais, independente de fatores reguladores externos. Landry & Mistlberger (2007) observaram uma correlação entre a atividade locomotora dos ratos precedente às refeições, com picos coincidentes aos do início do consumo de ração, que se reproduziu cinco dias seguidos após a retirada do alimento. Este movimento locomotor antecipatório às refeições (FAA, do inglês Food Anticipatory Activity) é usado por diversos outros autores para estudos envolvendo o comportamento alimentar em ratos (Mendoza et al., 2005; Landry et al., 2007b; Sheward et al., 2007; Kaur et al., 2008)

O fato da alimentação se reproduzir em períodos conhecidos, permite a determinação do estado de fome-saciedade de um rato, pelo comportamento alimentar dos dias anteriores ao da aferição do ritmo das refeições, com precisão aceitável para o estudo de variações hormonais circadianas, desde que se disponha de um método com acuidade suficiente para determinar o início e o fim das refeições. Alguns autores tem observado entretanto dissociação entre o FAA e os ritmos circadianos, relativizando desta forma o uso deste indicador de consumo alimentar (De Groot et al., 2004; Honma et al., 1983; Lax et al., 1999; Van Dijk & Strubbe, 2003; Sederholm et al., 2002).

A abordagem do hábito alimentar como um conjunto de eventos distribuídos no transcorrer do tempo e que obedecem a um padrão estabelecido, começou a ser estudado há pouco tempo (Schibler et al., 2003; Froy, 2007; Mendoza et al., 2008). É sabido que os ratos Wistar são animais de hábitos noturnos e que cerca de 80% da sua alimentação ocorre entre as 17:00h e 6:00h (Sidlo et al., 1995). Estudos iniciais no ritmo circadiano de roedores baseavam-se na oferta do alimento como estímulo, mas as correlações desta atividade com a neurofisiologia dos animais ainda é pouco estudada (Landry & Mistlberger, 2007). Pesquisas recentes associam a

expressão de clock genes a praticamente todos os órgãos dos mamíferos (Sladek et al., 2007). Devido à alimentação funcionar como um dos principais sincronizadores para este tipo de gene, o estudo do comportamento alimentar associado à neurofisiologia tem merecido atenção crescente.

A principal característica dos ritmos circadianos compreende a sincronização de ritmos ambientais, tais como a alternância claro-escuro ou a disponibilidade de alimento, com a dos ritmos metabólicos. Sabe-se também que osciladores endógenos produzem ritmos com periodicidade própria, que podem ou não ser sincronizados com eventos externos ao organismo (também chamados de zeitgeber, ou temporizador, em alemão). Durante tal envolvimento (chamado por vários autores de entrainment), os osciladores endógenos podem modificar seu sincronismo buscando entrar em fase com osciladores exógenos, estabelecendo uma relação estável de fase, ou seja harmonizam-se os osciladores endógenos e o zeitgeber. Este processo pode, entretanto, não ocorrer ou se dar de forma incompleta. Sabemos hoje que as oscilações endógenas estão frequentemente associadas a variações hormonais que, no caso da periodicidade alimentar, podem ser determinadas por efetores do processo de fome-saciedade. Se, por exemplo, for modificado o entrainment associado à oscilação da secreção de corticosterona, insulina e leptina, hormônios nutricionalmente induzidos, é provável que ocorra reorganização da amplitude e frequência dos eventos circadianos distribuídos ao longo do tempo (Itoh et al., 1980; Morimoto et al. 1977; Ahima et al., 1998; Tallet et al., 2008)

A perda da capacidade de sincronização possui um custo metabólico. Dependendo da idade, o zeitgeber pode gerar instabilidade no ritmo circadiano (Aschoff, 1989). Por outro lado, variações dos osciladores endógenos permitem a sincronização dentro de determinados limites. Em situações além do limite de plasticidade do ritmo, o organismo pode perder a capacidade de sincronização. A autonomia dos processos de oscilação endógena levam-no a desarticular sua interação com o meio, ou pelo menos a defasar o entrainment com as variáveis ambientais, determinando padrões de gasto ou depósito energético em desacordo com o meio ambiente. A ruptura deste entrainment e as conseqüências fisiológicas do mesmo tem sido extensivamente relacionadas à sincronizadores como a exposição aos períodos de claro-escuro, porém muito

pouco em relação à disponibilidade de nutrientes que por sua natureza rítmica, devem exercer similar efeito (Madrid et al, 1998).

Mais recentemente a descoberta dos clock genes acentuou a pesquisa sobre os ritmos biológicos. Sugere-se hoje que o mecanismo básico recai em mecanismos transcricionais/translacionais envolvendo alças cromossômicas de retroalimentação destes genes (Turek et al., 2006). Tal processo gênico permitiria o controle do ritmo através da ativação de genes relacionados com determinados comportamentos periódicos, tais como o hábito de comer (Turek et al., 2006; Halford et al., 1998; Feillet et al., 2006).

Os mamíferos, desde antes do nascimento, estabelecem um vínculo com a mãe através do consumo alimentar. Já foi demonstrado, por exemplo, que animais e humanos tendem a consumir o mesmo tipo de alimento que suas mães consumiram durante a gestação e amamentação (Galef, 1982, Sullivan et al, 1994). Tal comportamento é associado a diversos ritmos circadianos do metabolismo.

O conceito de impressão e programação metabólica explica diversas adaptações e patologias - adaptações mal resolvidas – que evolutivamente se integram no genoma de uma espécie. A impressão metabólica é gerada em um organismo pelo estímulo externo, em momento de susceptibilidade no desenvolvimento do organismo, chamado de janela crítica. O período embrionário, e o início da lactação são janelas críticas conhecidas. (Waterland & Garza, 1999; Moura et al., 2002A; Fleming et al., 2004) A programação metabólica é decorrente desta impressão, e é ela que causa as mudanças fenotípicas, e por mecanismos epigenéticos, também na expressão gênica (Simerly, 2008; Vige et al., 2008). Na medida em que o organismo é exposto à um contexto para o qual não está preparado, mudanças metabólicas começam a acontecer visando a sua adaptação. Novos requerimentos na síntese de proteínas, e conseqüentes modificações no DNA, se fazem necessárias. Algumas dessas modificações são repassadas a novas gerações, o que explica alguns mecanismos evolutivos de variabilidade genética.

Ratos submetidos à restrição protéica nos dez primeiros dias de lactação, quando adultos, mesmo em situação de alimentação normal no resto da vida, obtém um padrão de alimentação alterado e tal alteração associa-se às concentrações de insulina e leptina no início da vida (Moura et al., 2002a).

Também, Plagemann e colaboradores (1999) demonstraram indução de obesidade em ratos por redução de ninhada. A diminuição de lactantes provoca uma hiperfagia nos animais sobreviventes, devido ao aumento relativo de quantidade de leite oferecido. Encontra-se bem documentado que patologias maternas associadas à insulina, como o diabetes melitus, reprogramam o funcionamento da circuitaria neural hipotalâmica da prole, levando-a à obesidade (Franke et al., 2005; de Moura & Passos, 2005)

Deste modo, o estudo do padrão de comportamento alimentar de ratos normais e sobrepeso, submetidos à programação metabólica por superalimentação, correlacionado à expressão hipotalâmica de proteínas da cascata de sinalização da leptina e insulina, podem trazer interessantes contribuições na compreensão da plasticidade da sincronização de ritmos endógenos ligados à alimentação.

Objetivos

Objetivo Geral

Correlacionar ritmos neurofisiológicos endógenos com o comportamento alimentar em ratos

Objetivos específicos

Correlacionar a programação metabólica de animais com sobrepeso, com o ritmo circadiano neurofisiológico e com o comportamento alimentar.

Validar método capaz de registrar consumo alimentar, duração e intervalo entre as refeições, e configuração do padrão de comportamento alimentar de ratos Wistar.

Material e Métodos

Todos os modelos experimentais e métodos empregados, descritos a seguir, estão de acordo com o Comitê de Ética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (CEA/184/2007)

Impressão metabólica

Os animais usados foram criados no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ, sob condições de ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura de 23°C, com ração e água ad libitum. O acasalamento foi realizado por 15 dias na proporção de 3 fêmeas para 2 machos. Após a fecundação as fêmeas foram separadas e colocadas em gaiolas individuais durante a gestação.

Após o nascimento, os filhotes foram distribuídos da proporção de nove animais por fêmea lactante. Ninhadas com quantidade inferior a nove animais foram excluídas do experimento. Os animais do grupo sobrepeso (S) foram obtidos pelo processo de impressão metabólica por redução de ninhada, adaptado do método proposto por Plagemann e colaboradores (1999). No quarto dia de vida, as ninhadas formadas por 9 filhotes foram reduzidas a três animais do sexo masculino. Estes foram mantidos com a mãe por 21 dias, quando foram desmamados e mantidos em gaiolas de manutenção 40 x 45 cm em número de três animais, até o início dos experimentos. Os animais controle (C) foram amamentados sem a redução das ninhadas até o 21º dia, e mantidos, após o desmame, em gaiolas 40 x 45 cm, também com três animais do sexo masculino por gaiola. Ambos os grupos foram mantidos após o desmame em regime de 12:00h claro-escuro, ração e água ad libitum (figura 3).

Grupo Sobrepeso	9	3 filhotes	3 animais por gaiola	
		amamentação	crescimento	
(Dias Pós Nascimento)	0	3	21	90
Grupo Controle		9 filhotes	3 animais por gaiola	
		amamentação	crescimento	
(Dias Pós Nascimento)	0		21	90

Figura 3 – Esquema de obtenção dos animais dos grupos controle e sobrepeso, no qual, ao terceiro dia de nascimento, é executada a redução de ninhada de nove para três filhotes do sexo masculino.

Seleção e pareamento dos espécimes

Foram selecionados 6 pares de animais adultos, com 6 meses de idade do sexo masculino. Os animais do grupo sobrepeso pesaram pelo menos 25 % a mais que os animais do grupo controle.

Usamos uma sala escura, com temperatura mantida à 23°C, como sala de gravação. Os animais selecionados passaram por adaptação de pelo menos cinco dias antes do início dos experimentos, em gaiolas individuais de 40 x 45 cm, acondicionadas na sala. Neste período avaliamos a quantidade de ração e água ingeridas, e usamos como critérios de exclusão de espécimes dos experimentos, a ocorrência de sinais patológicos, como fezes pouco consistentes, erupções cutâneas, dificuldades respiratórias ou ingestão anormal de água.

O ciclo claro-escuro da sala de gravação foi idêntico ao empregado no biotério onde os animais foram criados: Claro das 7:00h às 19:00h e escuro das 19:00h às 7:00h.

Preenchidas estas condições, os animais eram mantidos na sala de gravação, e transferidos para as gaiolas de filmagem dois dias antes do início do registro sonoro e gravação dos vídeos, visando sua adaptação à gaiola com parede de vidro.

Mensuração do consumo de ração

Durante a manutenção e os experimentos, os animais receberam ração padrão comercial para roedores (Labina, Purina©) ad libitum.

O consumo de ração foi aferido em cinco experimentos diferentes. Cada experimento envolveu um animal controle e um experimental, com cerca de 25% de sobrepeso. O consumo foi medido em cinco dias consecutivos, pela diferença entre o peso da ração no início (18:00h) e fim (8:00h) da gravação dos registros, aferido em balança digital de 0,1 g de precisão (Quimis XP-3000). Ao separar a ração no comedouro, foi verificado se havia algum pedaço visível de ração no interior da caixa, misturado à maravalha usada para forrar a gaiola, que pudesse influenciar na aferição.

Registro do comportamento alimentar - Método Visual

Para o registro da alimentação, os animais pareados foram transferidos para gaiolas com face de vidro, de mesmas dimensões das gaiolas de estoque, que possibilitaram a visualização do acesso dos animais ao comedouro e bebedouro (figura 4). Os animais controle e sobrepeso eram dispostos ao acaso nas gaiolas da esquerda e direita, ficando a identificação da posição dos animais registrada apenas no protocolo do experimento. Assim as gaiolas não possuíam identificação que pudesse influenciar os observadores no registro dos dados.

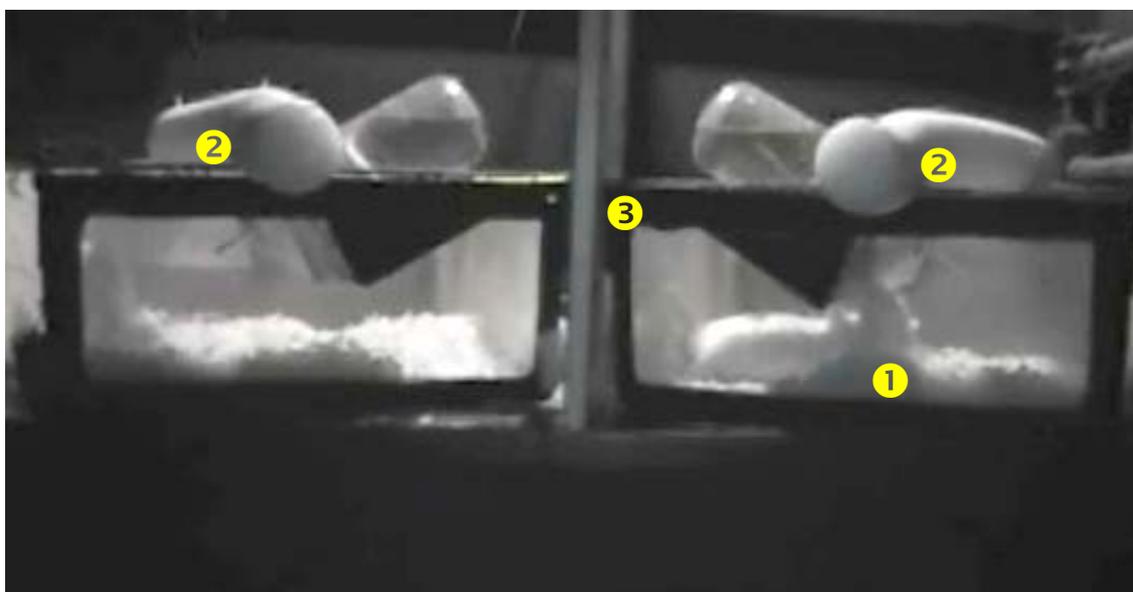


Figura 4 – Animais confinados em gaiolas de vidro durante a gravação de um experimento, com o animal da direita se alimentando em decúbito dorsal (1). Na parte de cima das gaiolas, ao lado dos bebedouros, nota-se o aparato acústico que isola os microfones do som ambiente (2). Uma divisória entre as duas gaiolas (3) reduziu a possibilidade de interferência, da atividade do animal de uma gaiola sobre a outra.

Para cada par de animais, foram gravados vídeos de 14:00h de duração, por pelo menos cinco dias consecutivos, das 18:00h às 8:00h do dia seguinte. Foi usada uma câmera digital Sony (DCR-HC30) acoplada à um microcomputador IBM-PC celeron, com 1 Gb de memória RAM, por uma interface firewire 1394. Os vídeos foram gravados diretamente no computador pelo software Windows Movie Maker (Microsoft Corp, USA). Ao término de cada gravação, os vídeos eram acelerados em 4x, com recursos de edição do próprio software de gravação, visando reduzir a reprodução para cerca de 3:30h preservando, porém, resolução suficiente para o registro visual dos eventos, traduzido pelo acesso dos animais ao comedouro. A ração do comedouro dos animais era pesada no início e fim das gravações, para o cálculo da quantidade de ração ingerida durante o experimento.

Estas edições aceleradas foram assistidas por observadores devidamente treinados, que registravam suas observações com o auxílio do software Chart for Windows 1.5 (ADInstruments Corp., AUS). Este software foi desenvolvido para o registro de sinais ao longo do tempo. Adaptamos um comando para registrar períodos em um arquivo gravado, de modo que, com o auxílio de uma tecla e da função clique-e-arraste do mouse, o observador pôde registrar o início e a duração de cada evento, distintamente para as gaiolas analisadas da esquerda e direita. Posteriormente, com o auxílio da ficha do experimento (ANEXO X – Ficha do Experimento), os dados dos animais do grupo controle e do sobrepeso eram identificados.

Registro do comportamento alimentar - Método Sonoro

Paralelamente ao registro visual, foi gravado o som dos animais roendo a ração. Um microfone USB (Logitech Inc., USA) foi adaptado à tampa da gaiola, de modo a captar os sons produzidos próximo ao comedouro. O som, gravado diretamente no formato MP3 pelo software StepVoice Recorder 1.5 (StepVoice Software, USA) em uma taxa de amostragem de 8 bits, frequência de 8 KHz, em formato monocal, foi interpretado com o uso do software Sound Forge 7.0 (SONY Pictures Digital Inc., USA). Este software possibilita a representação de arquivos MP3 em gráficos de linha, onde na abcissa, tem-se os valores de tempo, e na ordenada, a amplitude do sinal sonoro gravado. Os eventos de alimentação – as refeições – foram representados pela maior

freqüência de amplitudes altas, possibilitando a determinação gráfica dos eventos ocorridos em grandes intervalos, sob a forma de clusters desses sinais.

A validação do método baseado no som foi feita a partir da interpretação gráfica das ondas sonoras, plotadas pelo Sound Forge. Os eventos de consumo alimentar foram representados por regiões de maior amplitude nos gráficos. O observador captou, com o arraste do cursor do mouse sobre o gráfico, a hora exata com precisão de segundos, do começo, meio, fim e intervalo entre as refeições. O começo (R_c) caracterizou-se pelo início de uma deflexão positiva da curva. O fim da refeição (R_f) correspondeu à deflexão negativa subsequente, e o meio das refeições (R_m), o ponto central entre um R_c e o R_f seguinte. Os intervalos entre as refeições, ou momentos em que os ratos praticavam outras atividades (R_o) como sono, locomoção ou higiene, foram determinados por pontos entre um R_f e o R_c seguinte (figura 5).

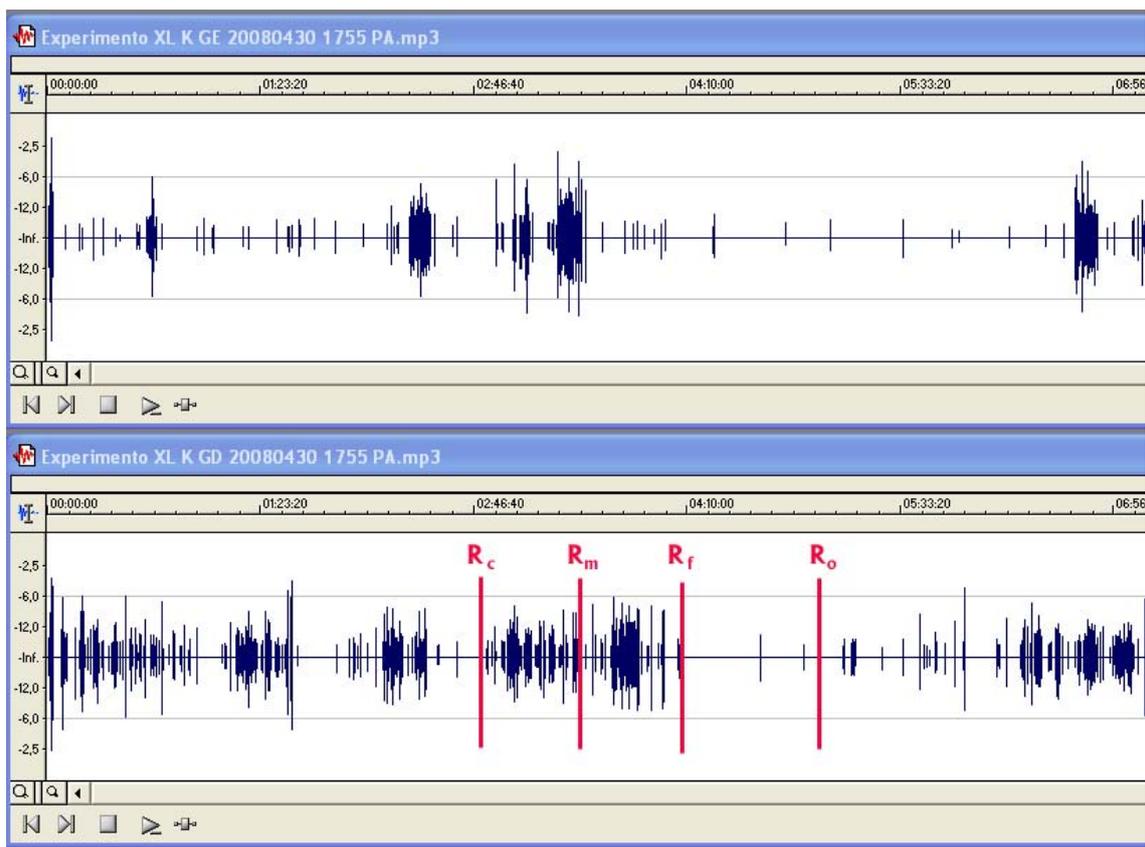


Figura 5 – Gráficos gerados pelo software Sound Forge, a partir dos arquivos MP3 da réplica K do experimento XL. Na parte superior, o gráfico gerado pela gaiola da esquerda, e na parte inferior, o da direita. Na ordenada observam-se os valores de amplitude, e na abcissa, a cronologia. Os maiores valores de amplitude representaram as refeições dos animais. As barras verticais vermelhas representam pontos R_c , R_f , R_m e R_o amostrados para verificação do comportamento do animal, no respectivo vídeo gravado.

Estes dados, traduzidos pela hora exata em que ocorreram, foram verificados nos vídeos dos experimentos, gerando uma frequência de coincidências, para os momentos de início, meio e fim de refeição e de outras atividades. Os observadores assinalaram os eventos coincidentes com 1, e os não coincidentes com zero. Para o ajuste das observações do filme, acelerado em 4x, com as observações gráficas dos arquivos MP3, foi usada a planilha eletrônica Excel (Microsoft Inc., USA)

Determinação do estado de fome e saciedade dos animais

Convencionou-se que o estado de fome dos animais seria determinado pelo momento imediatamente anterior ao do início da refeição com maior regularidade de ocorrência. Para a detecção destes momentos, os gráficos gerados pelo Sound Forge das cinco réplicas de cada experimento foram alinhados na tela do computador, e a maior coincidência de inícios de refeição foi usada como parâmetro para a determinação da hora do sacrifício dos animais. O momento do sacrifício dos animais em estado de saciedade foi determinado logo após o final da última refeição. Pela observação dos gráficos das réplicas, determinou-se o momento da última refeição, e, cinco minutos após o seu término, os animais saciados eram sacrificados (figura 6).

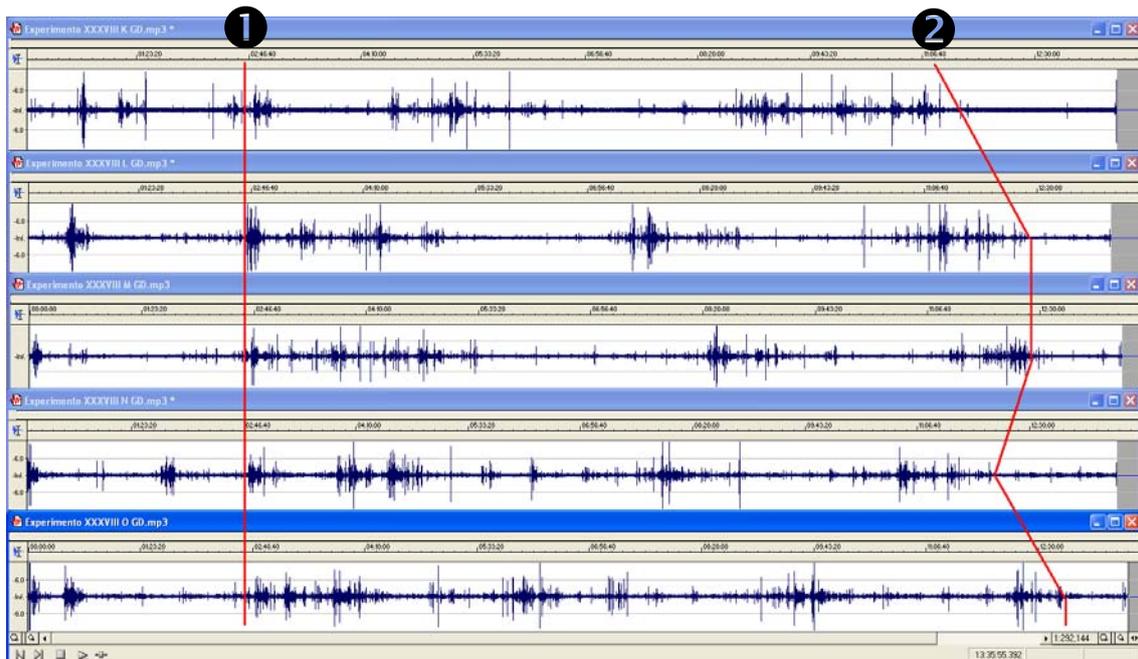


Figura 6 – Gráficos gerados pelo software Sound Forge, usados para a determinação da hora em que o animal de um experimento estaria com fome. As cinco réplicas do experimento, alinhadas verticalmente, neste caso, indicaram que o animal iniciou sua refeição mais regular 02:46h após o início da gravação das réplicas (1), o que correspondeu aproximadamente às 20:40h. O fim da última refeição do ciclo, apesar de variado (2), não interferiu no estabelecimento do estado de saciedade dos animais, visto que o observador esperava o animal terminar sua refeição para sacrificá-lo.

Comparação entre o ritmo alimentar dos dois grupos

A duração das refeições das réplicas de cada experimento, associada ao seu respectivo momento de início foi usada para gerar uma matriz tempo x tempo, expressa em minutos. Os dados dessa matriz, mapeados a partir do início do ciclo escuro (19:00h) foram ajustados em uma função senoidal (formula 1), com o auxílio do software Prism.

$$Y = \text{Amplitude} * \text{seno} ((2 * \pi * X / \text{Comprimento de onda}) + \text{FaseShift}) \quad (1)$$

Onde

Amplitude – Altura do ciclo, em minutos – variável diretamente proporcional à duração das refeições, em minutos.

Comprimento de Onda – Tempo de duração de um ciclo completo, em minutos.

FaseShift – Tempo decorrente do início do ciclo escuro até o primeiro evento.

π – Constante numérica – 3,1416

Análise do perfil dos animais

O peso e o comprimento naso-anal foram aferidos no momento do sacrifício, para a obtenção do índice de Lee (peso^{0,33} / comprimento naso-anal) (Rodrigues-Cunha, 2009).

A gordura visceral de cada animal foi dissecada, e pesada em balança de precisão (OHAUS AS200, USA), após os procedimentos cirúrgicos envolvidos na perfusão e extração dos cérebros.

No início da perfusão intracardíaca, no momento da incisão do átrio direito, foi coletado 2,5 mL de sangue em seringa descartável previamente rinsada com heparina. Este sangue foi imediatamente centrifugado a 3000 rpm em centrífuga refrigerada à 4°C por 10 minutos (Hermle Z360K, GER), para a obtenção do plasma sanguíneo, separado do centrifugado com o uso de pipetas de Pasteur. Este material foi congelado e mantido a -20°C para posterior análise da Glicose, Insulina e Leptina plasmática. A glicemia foi avaliada através de glicômetro (ACCU CHECK-Active, Roche®) com o uso de fitas-teste com glicose-oxidase. A insulina foi aferidas com o kit comercial INC Pharmaceuticals, com sensibilidade de 0,1 ng/mL, e a leptina, por um kit específico para murinos (Linco Research Inc., MO, EUA) com sensibilidade de 0,5 ng/mL.

Fixação do cérebro por perfusão transcardíaca

Os animais foram sacrificados após análise de seu estado de fome-saciedade, e submetidos à perfusão transcardíaca, para a qual foram anestesiados com thiopental a 16%, em dose de 1 mL por quilo de massa corpórea. A cavidade torácica foi exposta e o pericárdio e timo extraídos, para facilitar a introdução do scalp 19G, na extremidade inferior do ventrículo

esquerdo dos animais. Imediatamente após a introdução do scalp, era rompida a parede do átrio direito dos animais e ligada a bomba peristáltica em fluxo de gotejamento (6 mL/min.) com solução de NaCl 0,9%. Os animais foram submetidos à esta solução por cerca de dez minutos, ou até que seu fígado e pulmões apresentassem perda acentuada de coloração. Neste momento, procurou-se observar a ocorrência de extravasamento de líquido pelas narinas do espécime, o que indicava que a pequena circulação estava recebendo o perfusato, em detrimento da rede vascular cerebral. Neste caso procurou-se a correção do procedimento com a acomodação do scalp na aorta e oclusão das narinas dos animais, visando aumentar a pressão vascular da pequena circulação. Em seguida, a solução de salina foi substituída por uma solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4. A observação da contração de músculos da face indicava a preservação da circulação cerebral, que passava a receber o fixador durante os trinta minutos seguintes. Finalmente, os animais foram submetidos à perfusão de solução de sacarose 10% em solução de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4, durante dez minutos.

Finda a perfusão, os cérebros eram cuidadosamente extraídos e imersos em solução de sacarose 10% em paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4 durante duas horas, quando então eram imersos em solução de sacarose em tampão fosfato em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4 durante a noite.

Preparação das laminas para a imunohistoquímica do hipotálamo

O corte dos cérebros foi realizado em criomicrotomo (Slee Mainz Inc., Alemanha) regulado para obtenção de cortes de 25 micrometros de espessura. Para isto, os cérebros foram incluídos em meio para cortes congelados O.C.T. Tissue-Tek 4583 (Sakura, USA), com congelação em nitrogênio líquido durante a inclusão, evitando a formação de cristais de gelo, e conseqüente dano aos tecidos. Os cérebros foram montados de modo a permitir a obtenção de cortes coronais a partir da parte frontal do cérebro. Com o auxílio de um atlas estereotáxico do SNC (Paxinos e Watson, 1998) o espécime foi alinhado, de modo a fornecer cortes coronais de poções equivalentes dos dois hemisférios cerebrais. Os cortes foram desprezados até o surgimento do hipocampo e

alongamento do terceiro ventrículo, indicativo da presença do início do ARC na região hipotalâmica do cérebro. A partir daí, os cortes foram recolhidos em lâminas gelatinizadas de modo seriado. Dispostos em três cortes por lâmina. Cada um foi recolhido seqüencialmente em uma posição da lâmina, permitindo que cada lâmina contivesse regiões distintas do ARC. As lâminas serialmente numeradas, foram embrulhadas em pacotes de papel laminado, e armazenadas em freezer a -20°C.

A expressão de POMC, NPY e IRS2 no hipotálamo dos animais, foi avaliada em grupos de animais controle com fome (CF), controle saciados (CS), sobrepeso com fome (SF) e sobrepeso saciados (SS). Para análise da importância do estado de fome-saciedade dos animais, os dados dos animais com fome e saciados foram agrupados e analisados como grupo Controle e Sobrepeso.

A imunomarcção para a identificação das proteínas foi feita em lâminas de numeração semelhante, fazendo com que a comparação entre os animais se desse em regiões semelhantes do ARC. Para a identificação de POMC usou-se o anticorpo primário POMC FL-267 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), em diluição de 1:200. A identificação de NPY foi feita com o uso do anticorpo primário NPY N 9528 (Sigma-Aldrich Inc., USA) na diluição de 1:4000, e a marcação de IRS2, foi feita com o uso do anti-corpo primário IRS-2 M19 (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) com a diluição de 1:150.

Para todas as marcações, foi usada a 3,3' diaminobenzidina como marcador secundário.

Dispostas em bandeja de análise histológica, duas lâminas de cada espécime, contendo no total seis cortes de regiões distintas do núcleo arqueado, foram usadas para cada marcação. Cada corte recebeu seis lavagens de cinco minutos cada, com triton X-100 0,3% em tampão fosfato diluído em salina (PBS), pH 7,4. Posteriormente, os cortes foram incubados com NGS 10% diluído em PBS, pH 7,4, por duas horas. Após a retirada do PBS, cada corte recebeu 40 µL do anticorpo primário. As bandejas com as lâminas foram acondicionadas em câmara úmida no interior de um refrigerador à 4°C durante a noite. No dia seguinte, os cortes foram submetidos a seis lavagens de cinco minutos cada com PBS pH 7,4, e incubados com anticorpo anti-rabbit biotilado 1:200 diluído em PBS pH 7,4 por sessenta minutos. Em

seguida foram novamente submetidos a seis lavagens de cinco minutos cada com PBS pH 7,4, e incubados com streptavidina associada à HRP diluída a 1:150 em PBS pH 7,4 por trinta minutos. Após esta incubação, foram submetidos a três lavagens de cinco minutos com PBS pH 7,4, e três lavagens com tampão fosfato. Incubamos os cortes com DAB inativo por quinze minutos seguido de incubação com Peróxido de hidrogênio 0,006% diluído em DAB (DAB ativado) por aproximadamente 15 minutos ou até que os cortes apresentassem coloração castanho clara. A incubação foi interrompida com três lavagens de cinco minutos cada com tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 seguido de três lavagens com H₂O destilada. As lâminas foram secas naturalmente durante a noite, e montadas de solução de Damar, no dia seguinte, após banhos sucessivos de álcool em concentração crescente e Xilol, para a devida desidratação e diafanização dos cortes.

Todas as lâminas de cada anticorpo foram coradas simultaneamente, visando minimizar possíveis variações de coloração, induzidas por diferentes revelações de DAB.

Análise dos cortes histológicos

A representação quantitativa da imunohistoquímica, foi feita com o uso de cinco cortes semi-seriados de cada espécime, de regiões hipotalâmicas que continham porções mediais do núcleo arqueado, para cada imunomarcador. De cada corte, foram obtidas imagens microscópicas digitalizadas de três campos, em aumento aproximado de 1000x, e resolução de 1,4 Mpixels. A delimitação da região hipotalâmica do núcleo arqueado foi realizada com o auxílio da versão computadorizada de um atlas estereotáxico (Paxinos e Watson, 1998). A partir da observação de alguns acidentes anatômicos no corte, como o formato do terceiro ventrículo, procurou-se identificar nos esquemas do atlas, o formato correspondente do núcleo arqueado, para que o campo do microscópio no aumento de 1000x contivesse apenas porções do ARC. A soma da área das imagens compreendeu pelo menos 60% da região hipotalâmica do núcleo arqueado no corte. O sistema de vídeomicroscopia usado era composto de uma câmera digital Optronics (Optronics Inc., USA) acoplada à um microscópio Olympus BX40 (Olympus Inc., USA) equipado com lentes plan acromáticas, e à um microcomputador PC.

O reconhecimento das estruturas marcadas foi feito por segmentação interativa de cores (Polkowska et al., 2006; Ramos et al., 2005; Marenko et al., 2005) em processo que permitiu a exclusão manual de artefatos histológicos, como hemácias, que pudessem interferir no resultado da quantificação do campo. O software usado para a análise das imagens foi o Image Pro Plus (Media Cybernetics Inc., USA) (figura 7) e os dados obtidos foram tabulados com o auxílio da planilha eletrônica Excel (Microsoft Inc., USA).

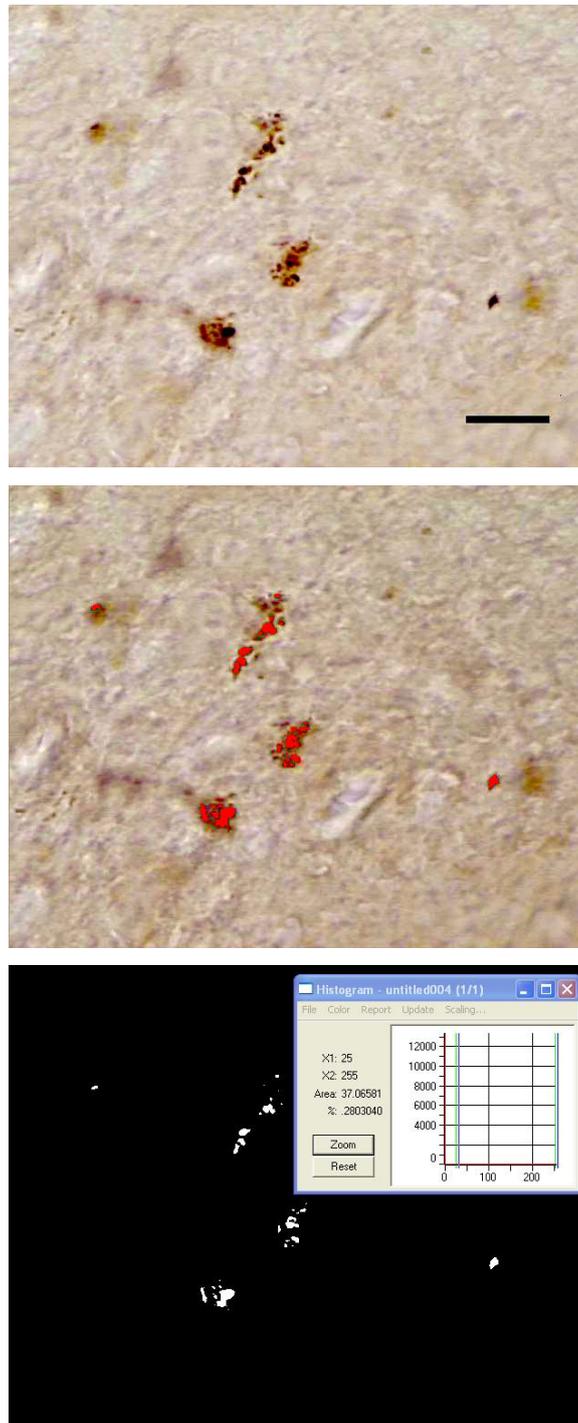


Figura 7 – Método de análise quantitativa das lamina histológicas da imunohistoquímica. Acima, uma imagem capturada é carregada para análise. A barra de calibração possui 10 μm . Ao centro, segmentação das cores correspondentes à área imunomarcada. Abaixo, a máscara binária da segmentação, e sua quantificação, em termos de área relativa imunomarcada, representada no histograma sobreposto à imagem.

Análise estatística.

Para a análise comparativa entre os grupos C e S, CF e CS, SF e SS, em relação ao consumo de ração, massa corporal, gordura visceral, comprimento naso-anal, índice de Lee, bem como taxas hormonais plasmáticas de glicose, insulina e leptina, expressão dos neuroreceptores NPY, POMC e IRS2 no núcleo arqueado do hipotálamo, usamos o teste de Mann-Whitney em nível de significância de 0,05%, com o auxílio do software Prism 4.0 (GraphPad Inc., USA)

Para a comparação entre os métodos visual e sonoro, de registro do ritmo circadiano da alimentação, usamos a estatística Kappa levando em consideração as observações repetidas em um mesmo animal. Avaliou-se as coincidências entre os eventos início (I), meio (M) e fim (F) de alimentação, e outros eventos (O), com o auxílio do software SAS 9.1 (SAS Institute, NC, USA)

Para a comparação das curvas dos ritmos circadianos dos animais controle e sobrepeso, os dados de início e duração das refeições, em minutos, ajustados para uma função senoidal, foram comparados pela variância do comprimento de onda e frequência de cada ciclo, com o uso do software Prism 4.0.

Resultados

Perfil biométrico e metabólico dos animais

Os animais do grupo controle apresentaram médias de leptina, insulina e glicose plasmática inferiores aos do grupo sobrepeso (Tabela 1). O comprimento naso-anal dos animais não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e o experimental mas a massa corporal, o índice de Lee e o teor de gordura visceral foram maiores no grupo sobrepeso.

Tabela 1 – Média e erro padrão (EP) dos dados biométricos e hormonais de animais dos grupos Controle e Sobrepeso.

	Controle (média±EP)	Sobrepeso (média±EP)	P (teste de Mann-Whitney)
Massa Corporal (g)	329,1±9,37	457,6±8,72	<0,001
Comprimento Naso-Anal (cm)	25,2±0,10	25,3±0,10	0,3701
Índice de Lee (IL)	0,27±0,002	0,30±0,003	<0,001
Gordura Visceral	2,4±0,1	5,9±0,3	<0,001
Glicose plasmática (mg/dL)	90±5,4	122±11	<0,05
Insulina Plasmática (uUI/mL)	31,3±3	59±6,7	<0,05
Leptina Plasmática (ng/mL)	3,4±0,02	7,7±1,3	<0,001

Consumo de Ração

Os animais sobrepeso consumiram mais ração do que os controle em todos os experimentos avaliados. Embora o consumo relativo ao peso do animal não tenha apresentado diferença significativa para um intervalo de confiança de 95%, o consumo ponderado pelo índice de Lee foi diretamente proporcional ao consumo absoluto de ração ingerida por animal durante a gravação dos experimentos e também mostrou diferença significativa (tabela 2)

Tabela 2 – Consumo de ração absoluto, e ponderado pelo peso do animal e pelo índice de Lee.

	Controle (média±EP)	Sobrepeso (média±EP)	P (teste de Mann-Whitney)
Consumo absoluto (g)	16,1±0,31	20,4±0,67	0,0002
Consumo/Peso do Animal (g)	0,049±0,0018	0,045±0,005	0,0566
Consumo/Índice de Lee (g)	3,4±0,02	7,7±1,3	0,0030

Comportamento Alimentar

Os animais do grupo sobrepeso, não apresentaram maior número de refeições no período da gravação dos experimentos (controle=9,3±0,76 vs sobrepeso=10,8±1,09, p=0,6991), porém suas refeições foram mais longas (controle=10,5±0,81 min. vs sobrepeso=13,2±1,01 min., p=0,0411), e o intervalo entre elas, mais curto (controle=78,0±6,39 min. vs sobrepeso=60,33±4,09 min., p=0,026) (figura 8)

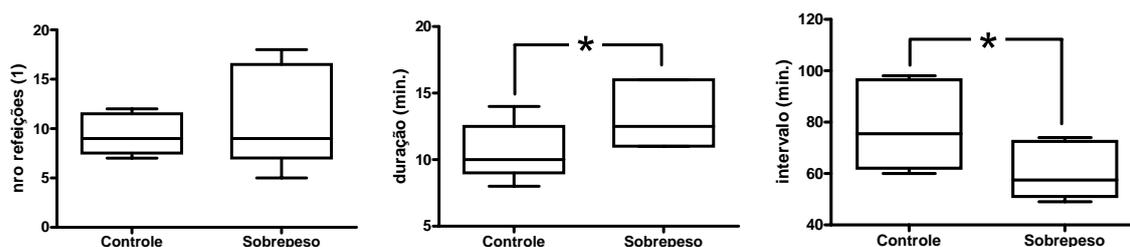


Figura 8 – Frequência, duração e intervalo entre as refeições no período das 17:00h às 8:00h.

A função senoidal derivada dos dados de início de refeições, relacionados às respectivas durações, gerou amplitudes e comprimentos de onda significativamente diferentes entre os dois grupos. O grupo sobrepeso teve um comprimento de onda menor e consequente maior frequência de ciclos, associada à uma amplitude significativamente maior, caracterizando um padrão hiperfágico de refeições maiores, com intervalos mais curtos (figura 9; Tabela 3).

Tabela 3 – Estatística descritiva e resultados do teste F na comparação da regressão senoidal dos dados de início de refeição, potencializados pelas respectivas durações dos eventos

Dados		Controle	Sobrepeso
Best Fit ± EP	<i>Amplitude</i>	0,67±1,321	2,43±1,707
	<i>Comprimento de Onda</i>	8,424±0,0193	7,892±0,0010
Variância (IC de 95%)	<i>Amplitude</i>	0,0 a 3,263	0,0 a 5,778
	<i>Comprimento de Onda</i>	8,386 a 8,462	7,873 a 7,912
Teste F	<i>Amplitude</i>	p=0,02	
	<i>Comprimento de Onda</i>	p=0,0338	

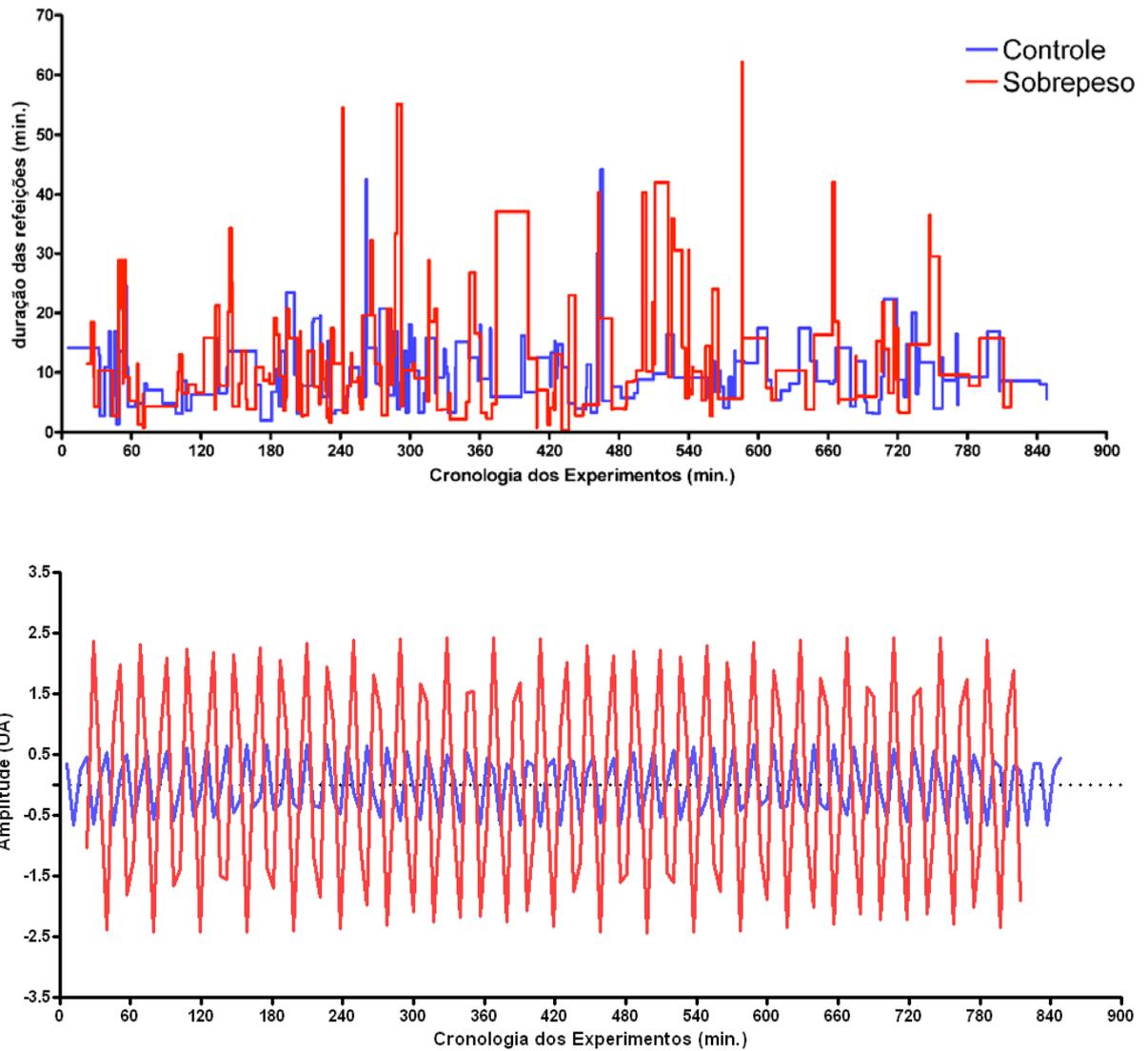


Figura 9 – Acima – Gráfico com a indicação de inícios das refeições relacionados pelas respectivas durações, em minutos x minutos. Abaixo – representação dos dados da função senoidal derivada, para a comparação dos ritmos de alimentação de cada grupo, a partir das amplitudes e comprimentos de onda, em minutos x unidades arbitrárias (UA).

Validação do Método Sonoro

A concordância dos dados obtidos do método sonoro com o método visual, considerado padrão ouro – a análise dos vídeos - foi excelente (valor de Kappa= 0,88 com intervalo de confiança de 95%, de 0,71 -1,0).

Imunohistoquímica

Foi detectada uma diferença significativa na expressão da proteína POMC quando os animais foram agrupados em controle e sobrepeso (C=. Porém, quando o estado metabólico dos animais foi discriminado, esta diferença se manteve apenas na comparação do grupo controle com fome e sobrepeso com fome (figura 10.A; figura 11; Tabela 4)

Tabela 4 – Área relativa ocupada por células imunomarcadas para o neuropeptídeo POMC, no ARC hipotalâmico.

Grupos	Média±EP	P (Mann-Whitney)
Controle	0,751±0,1285	0,0029
Sobrepeso	0,273±0,0734	
Controle com Fome	0,779±0,1777	0,8413
Controle Saciado	0,723±0,2056	
Sobrepeso com Fome	0,273±0,0742	1
Sobrepeso Saciado	0,371±0,1350	

Embora os animais agrupados em Controle e Sobrepeso não tenham apresentado diferença significativa para a expressão da proteína NPY, foi detectada uma diferença considerável entre os grupos controle com fome e controle saciado. (figura 10.B; figura 12; Tabela 5).

Tabela 5 – Área relativa ocupada por células imunomarcadas para o neuropeptídeo NPY, no ARC hipotalâmico.

Grupos	Média±EP	P (Mann-Whitney)
Controle	0,544±0,1233	0,6395
Sobrepeso	0,581±0,0979	
Controle com Fome	0,226±0,0557	0,0079
Controle Saciado	0,863±0,1208	
Sobrepeso com Fome	0,461±0,1283	0,3095
Sobrepeso Saciado	0,700±0,1396	

Na expressão de IRS2 foi encontrada diferença significativa nos animais agrupados em Controle e Sobrepeso, Porém este resultado só se reproduziu na comparação entre CF e SF, bem como entre CS e SS. Quando discriminados por estado metabólico, a comparação intergrupo dos controles e sobrepesos não apresentou diferença significativa (figura 10.C; figura 13; Tabela 6).

Tabela 6 – Área relativa ocupada por células imunomarcadas para o neuroreceptor IRS2, no ARC hipotalâmico.

Grupos	Média±EP	P (Mann-Whitney)
Controle	0,570±0,0815	< 0,0001
Sobrepeso	0,090±0,0204	
Controle com Fome	0,550±0,1094	1,0
Controle Saciado	0,591±0,1332	
Sobrepeso com Fome	0,120±0,0296	0,1255
Sobrepeso Saciado	0,072±0,0178	

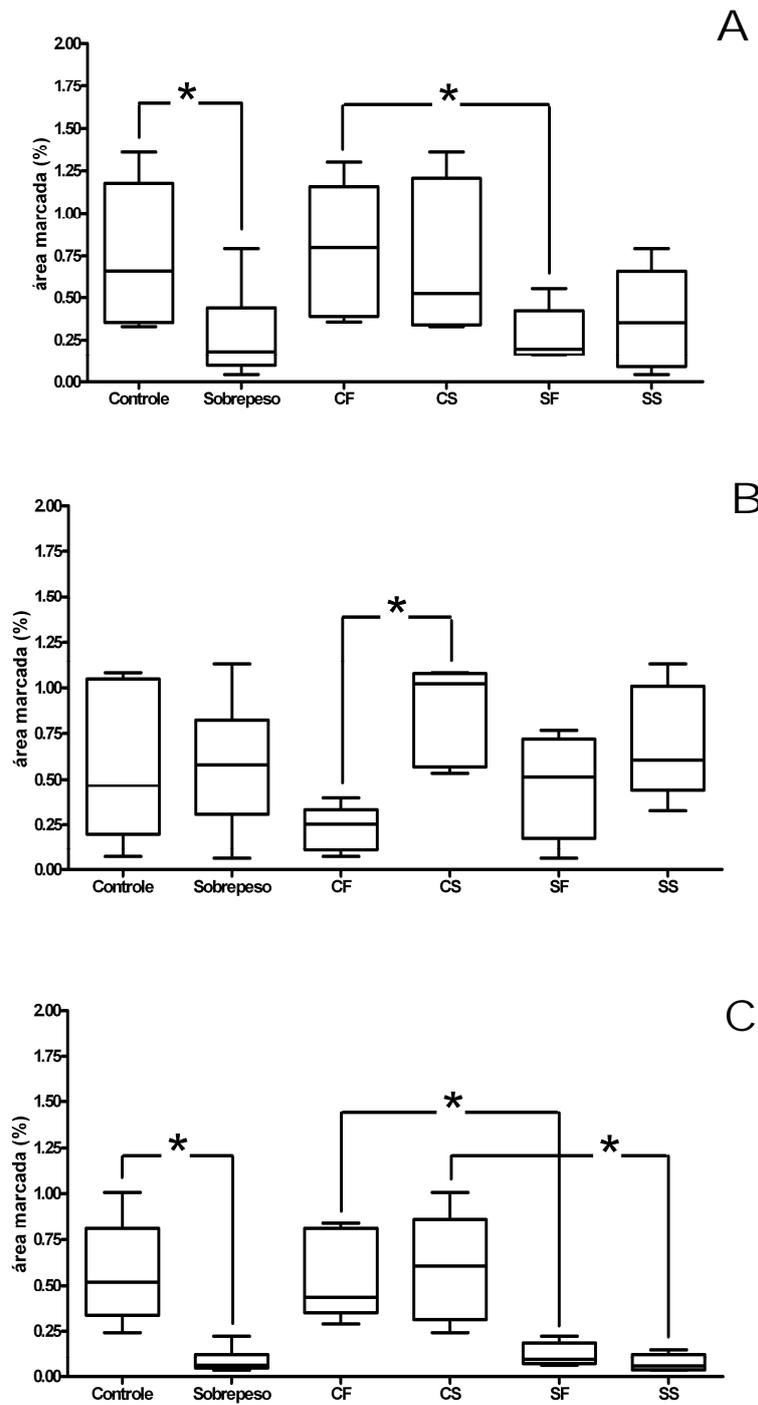


Figura 10 - Gráficos Box-wiskar com os dados de área relativa ocupada por neurônios POMC (A), NPY (B) e IRS2 (C) imunomarcados no núcleo arqueado de ratos controle e sobrepeso. As quatro últimas colunas de cada gráfico representam os dados dos animais discriminados por estado metabólico (CF=Controle com fome; CS=Controle Saciado; SF=Sobrepeso com Fome e SS= Sobrepeso Saciado)

{ SHAPE * MERGEFORMAT }

Figura 11 – Campos microscópicos da imunohistoquímica do neuropeptídeo POMC no núcleo arqueado, típicos dos grupos CF (canto superior esquerdo), CS (canto superior direito), SF (canto inferior esquerdo) e SS (canto inferior direito). A barra de calibração, no canto inferior direito de cada imagem possui 10 µm.

{ PAGE * MERGEFORMAT }

{ SHAPE * MERGEFORMAT }

Figura 12 – Campos microscópicos da imunohistoquímica do neuropeptídeo NPY no núcleo arqueado, típicos dos grupos CF (canto superior esquerdo), CS (canto superior direito), SF (canto inferior esquerdo) e SS (canto inferior direito). A barra de calibração, no canto inferior direito de cada imagem possui 10 μ m.

{ PAGE * MERGEFORMAT }

{ SHAPE * MERGEFORMAT }

Figura 13 – Campos microscópicos da imunohistoquímica do substrato de receptor de insulina IRS2 no núcleo arqueado, típicos dos grupos CF (canto superior esquerdo), CS (canto superior direito), SF (canto inferior esquerdo) e SS (canto inferior direito). A barra de calibração, no canto inferior direito de cada imagem possui 10 μm .

{ PAGE * MERGEFORMAT }

Discussão

Alterações externas ao organismo quando ocorridas em momentos críticos do desenvolvimento, podem gerar adaptações permanentes por programação metabólica. Agentes tóxicos, como pesticidas e outros estímulos externos são capazes de provocar este tipo de resposta (Johri et al., 2006; Bagley & Hayes, 1985), bem como o comportamento alimentar no adulto, por exemplo, pode ser modificado por variação nutricional na gestação ou lactação (Moura et al., 2002a; Moura et al., 2002b; Barja-Fidalgo et al., 2003; Kozak et al., 2006)

Nesta direção, o modelo experimental baseado nos trabalhos de Plagemann e colaboradores (1999) tem sido um procedimento fundamental para a compreensão do processo da impressão e programação metabólica e tem sido usado com sucesso pelo nosso grupo de pesquisa na obtenção e estudo de animais com sobrepeso (Rodrigues-Cunha et al., 2008; Rodrigues, 2008). Desta forma, a impressão metabólica através da hipernutrição no início da vida, programou metabólicamente os animais do grupo sobrepeso, que, quando adultos, apresentaram aumento de peso e hiperfagia. O efeito da impressão metabólica no organismo foi comprovado pela associação do fenótipo sobrepeso, com a expressão nos neurônios POMC, NPY e IRS2 no núcleo arqueado, diferenciada entre os animais do grupo controle e do sobrepeso. O NPY dos animais metabolicamente reprogramados não variou significativamente entre os estados de fome-saciedade, apontando possíveis diferenças nos mecanismos de regulação da homeostase. Os dados da expressão de POMC apresentaram diferença significativa entre os grupos controle e sobrepeso, indicando que os animais metabolicamente reprogramados apresentam alterações no ritmo circadiano alimentar, influenciados por mecanismos de longo prazo ligados à saciedade. A expressão do substrato de receptores de insulina no ARC corroboram a diferença entre os dois grupos.

Os estudos sobre hiperfagia concentram-se nas alterações hipotalâmicas (Shioda et al., 2008). Em nosso trabalho, nos animais submetidos à impressão metabólica durante a janela crítica da lactação, foram observadas alterações no ARC, algumas das quais já descritas por outros autores (Plagemann et al., 1999; Cruz Mezzomo, 2008; Marcelino et al., 2004).

Entretanto, nossos resultados apresentaram divergências em relação à expressão da atividade de neurônios NPY no ARC, no estado metabólico de fome-saciedade, nos animais do grupo controle. Alguns importantes estudos apontam os neurônios NPY e POMC como moduladores sincronizados do processo de fome e saciedade. Pinto e colaboradores (2004), por exemplo, associaram a alteração da atividade de neurônios NPY e POMC com o aumento do consumo alimentar, em ratos ob-ob. Nestes animais, a injeção de leptina plasmática causou um efeito quase que imediato na sensibilização destes neurônios do ARC, o que reforça o papel dos componentes endógenos no comportamento alimentar hiperfágico. Desta forma, esperava-se que a hiperleptinemia observada em nossos animais induzisse uma maior sensibilidade dos neurônios do ARC. Entretanto, nossas observações sugerem que o mecanismo NPY e POMC não se dá de forma unificada, imediatamente recíproca, e que o POMC possui preponderância na determinação do processo de fome e saciedade. Como será discutido abaixo, poucos estudos levam em consideração o estado de fome-saciedade dos animais como algo dinâmico, assim como o ritmo circadiano envolvido na alimentação.

Apesar do grande número de trabalhos a respeito destes neuroreceptores, ainda pouco se conhece sobre a dinâmica da sua expressão circadiana. Uma possibilidade explicativa para interpretação de nossos resultados diz respeito à uma defasagem da curva de expressão do NPY em relação ao que se esperaria sob sua dinâmica relacionada às refeições. Os animais controle com fome foram sacrificados em momentos imediatamente anteriores às refeições, e os controle saciados em momentos imediatamente posteriores. Este achado poderia estar de acordo com o mecanismo neural conhecido da fome-saciedade no ARC, se fosse considerado um retardo na expressão do NPY em relação ao ato de comer dos animais. Assim, imediatamente após as refeições, os animais ainda estariam com seus níveis de NPY relativamente elevados, justificando a maior expressão destes neurônios no ARC.

Não há consenso na literatura sobre a expressão do NPY nas condições deste trabalho. Woods e colaboradores (1998), por exemplo, mostraram expressão anormal da atividade destes neurônios, quando animais são privados da alimentação. Kalra & Kalra (2004) afirmam que tanto o aumento

como a diminuição da expressão do NPY hipotalâmico podem estar associadas ao comportamento hiperfágico. Deve-se levar em consideração também que poucos trabalhos procuraram quantificar a expressão destes neurônios por análise de imagens. Os trabalhos que o fizeram, analisaram o ARC em baixo aumento, onde os campos microscópicos compreendiam outras áreas do hipotálamo. Nessa situação, possíveis artefatos histológicos poderiam influenciar na quantificação. A delimitação do ARC, e a hipermarcação por inclusão de background foram vieses minimizados na análise realizada neste trabalho. Usamos um método de quantificação baseado em análise de imagens, nos precavendo de possíveis desvios em função da morfologia do ARC. Optamos por interpretar os cortes em aumento de 1000x, tornando-os anisotrópicos e tomamos o cuidado de comparar regiões semelhantes do ARC, próximas ao centro longitudinal do hipotálamo, para evitar possíveis variações nas populações neuronais, devido à distribuição irregular no próprio ARC.

Os animais do grupo sobrepeso, com pelo menos 25% de sobrepeso em relação aos animais do grupo controle, poderiam ter ganho massa corpórea por distúrbios na digestão e absorção dos nutrientes. Mas o comportamento hiperfágico, confirmado pelo resultado de outros autores (Plagemann et al., 1999; Farley et al., 2003; Willians et al., 2001), e comprovado aqui pelo consumo absoluto e o ponderado pelo índice de Lee, sem dúvida, foi componente relevante no acúmulo de reservas. Esta hiperfagia parece estar sendo induzida por mecanismos de balanço homeostático de longo prazo, visto que a resistência à insulina e à leptina, demonstrada aqui pelos índices plasmáticos elevados nos animais do grupo sobrepeso estão associadas à baixa expressão hipotalâmica dos neurônios POMC e IRS2 nos animais sobrepeso, tanto na fome quanto na saciedade.

A maior parte dos estudos sobre o comportamento alimentar em modelos animais possui pequena capacidade de discriminação dos processos de fome e saciedade. Uma principal diferença entre os estudos de comportamento alimentar em humanos e em modelos animais é a incapacidade técnica de registro e quantificação da sensação de fome e saciedade neste último. Alguns estudos procuram realizar a discriminação entre os comportamentos através de protocolos experimentais nas quais ocorre manipulação do animal através de jejum prolongado, sinonimo de animal com

fome. Em outros estudos, os animais são alimentados em períodos específicos de tempo, por exemplo, duas horas por dia. Ambas técnicas tem as suas vantagens em seus objetivos científicos, como por exemplo, o exame de áreas do cérebro alteradas por tais manipulações, são entretanto, de difícil aplicação quando se pretende estudar um fenômeno ontologicamente instituído. No estudo do processo de impressão metabólica no início da vida, parte do escopo do nosso trabalho, o uso das técnicas acima descritas acrescentariam variáveis de difícil discriminação.

A utilização de métodos de observação baseados na FAA, gera problemas que reduzem a perspectiva de respostas desejadas em nosso trabalho. Por exemplo, de Groot e colaboradores (2004), constataram que o ambiente de confinamento de camundongos influencia o FAA sem alterar o consumo alimentar. Honma e colaboradores (1983) verificaram que a própria alteração na oferta de alimento poderia alterar o FAA por alguns dias subsequentes, mesmo após a normalização da ração, indicando um ritmo circadiano ao menos parcialmente independente do ritmo do consumo alimentar. Lax e colaboradores (1999) evidenciaram a influência da luz sobre o FAA. Van Dijk e Strubbe (2003) observaram que injeções de NPY no PVN hipotalâmico aumentavam o consumo de ração sem, contudo, alterar a FAA. Sederholm e colaboradores (2002), ao injetar NPY na cavidade ventricular de ratos observaram uma diminuição no consumo de solução glicosada, porém com um aumento no número de visitas ao bebedouro. Neste sentido, alguns autores separam o comportamento do consumo alimentar, caracterizado pela ingestão do alimento, do comportamento do apetite, caracterizado pela visita do animal ao comedouro, sem a necessária ingestão (Baird, 2006), ao qual o FAA parece estar mais associado. Se o ritmo alimentar é regido por múltiplos fatores, o FAA também o é. Isto, por si só, justifica o cuidado no uso do FAA como indicador de comportamento associado a algum estado metabólico relacionado à alimentação.

Considerou-se, a princípio, que o método de observação visual, baseado no registro de gravação de vídeos, seria o mais adequado para o nosso estudo. Neste, não há nenhuma interferência experimental. Ou seja, o animal não é submetido a uma modificação comportamental que poderia per si fazer parte da constituição do comportamento que nos interessava estudar. Entretanto,

mesmo que tal método se mostrasse preciso na detecção dos eventos – início meio e fim de uma refeição – bem como do momento cronológico em que o evento acontecia, mostrou-se trabalhoso na obtenção e tratamento dos dados. O processamento dos filmes de 14:00h de duração após o término da gravação, embora automatizado, levou algo em torno de 00:40h. Os filmes acelerados continham 3:30h de duração. Ainda que os animais passassem boa parte do tempo dormindo, o que permitia aos observadores acelerar a exibição dos filmes, o tempo para o registro dos dados nunca foi inferior à 01:00h. Ao adicionar-se a este tempo, o pós-processamento dos dados, necessário para a detecção das refeições, o tempo total entre o fim da gravação e a interpretação dos dados passa de 02:00h, o que torna o método visual apesar de preciso, trabalhoso. Acrescenta-se também, que o envolvimento de diversos observadores na obtenção dos dados, aumenta a geração de erros decorrentes das variações inter-individuais na observação. Outros métodos de registro, baseados em dispositivos eletrônicos acoplados a computadores também tem sido usados no estudo do comportamento alimentar (Barrio Lera, 1999; Farley et al., 2003; Jurgens et al., 2006), e conferem a agilidade desejada na obtenção dos dados, porém, possuem dois problemas não negligenciáveis: são caros e de difícil manutenção no ambiente de um biotério.

Optou-se por desenvolver um novo método baseado no registro de som. Este possui como princípio básico o pressuposto que o ato de comer dos roedores emite som, de pouca variação entre sujeitos, e pode ser registrado, armazenado e analisado. Este método baseia-se em um dispositivo eletrônico simples e robusto – um microfone digital. Além disso, sua adaptação a uma gaiola convencional de estoque dos animais mostrou-se simples, e pouco invasiva, interferindo pouco no ambiente em que o animal se encontra, evitando possíveis desvios comportamentais na alimentação. A comparação com o método visual, assumido como “padrão ouro” na observação, quanto ao momento central das refeições, mostrou concordância excelente. A análise das bordas – início e fim - das refeições também apresentou grande similaridade com o padrão ouro. Deste modo, o método sonoro mostrou ser mais eficiente no registro dos dados das refeições. Com ele, é possível a gravação de informações em longos períodos, de modo contínuo, ocupando pouco espaço

de armazenamento de dados. A possibilidade de interpretação rápida e precisa, pode ser adaptada para a interpretação automatizada dos dados.

Utilizando o método sonoro foi possível a discriminação e sacrifício dos animais em momentos considerados metabolicamente particulares. Em termos do estudo, associando o comportamento alimentar com o estado metabólico (fome-saciedade), observou-se que os animais agrupados com fome e saciados sempre tinham o seu estado metabólico associado a peculiar expressão dos neurônios POMC, NPY e IRS2 no ARC.

Estudando ratos hiperfágicos em modelo de obesidade induzida por dieta rica em ácidos graxos Farley e colaboradores (2003) demonstraram que o maior consumo de ração se dá pelo aumento da duração, e não do número de refeições. Os dados obtidos nesse trabalho com o uso do modelo sonoro confirmam este padrão de alimentação, e apontam também para a diminuição do intervalo entre as refeições no grupo sobrepeso. Os intervalos poderiam ser menores simplesmente pela maior duração das refeições, porém, a expressão do neuropeptídeo POMC no ARC, sugerem a saciedade como uma possível causadora desta relativa diminuição. Embora a variação intergrupo, entre os estados de fome-saciedade, não tenham sido estatisticamente significativas, a menor expressão no grupo sobrepeso em relação ao grupo controle sugere que o POMC pode estar influenciando neste processo.

A simplificação da obtenção dos dados e interpretação dos resultados, e a possibilidade de regressão a funções periódicas relativamente simples, como a função senoidal e a série de Fourier empregadas neste trabalho, pode servir de subsídio para o desenvolvimento de um sistema semi-automatizado que auxilie pesquisas sobre ritmos circadianos da alimentação em ratos. A modelagem computacional de ritmos circadianos já foi feita por alguns autores (Cardoso et al., 2009; Roenenberg et al., 2008) e a adaptação de um modelo para a análise dos dados em tempo real, com características preditivas em um algoritmo computacional é uma meta a ser cumprida pelo nosso grupo. Alguns autores afirmam que o ritmo intradiano das refeições se reproduz nos períodos circadianos (Davidson et al., 2005; Landry & Mistlberger, 2007). Isto possibilita a tomada de decisão baseada na probabilidade do espécime estar ou não se alimentando em determinado momento do dia seguinte, permitindo ao pesquisador o planejamento de um experimento. Por exemplo, a associação

entre as influências externas na organização do ritmo circadiano. Alterações do ritmo por alteração da luz em frequência e intensidade poderiam agir nos núcleos da amígdala em específicos “clock genes”, reorganizando padrões alimentares. Em nosso estudo a luz foi mantida constante, o que talvez indique a existência de outros fatores indutores da reorganização do padrão de alimentação.

Também, além da compreensão da dinâmica hipotalâmica e sua reorganização durante a constituição do processo de fome-saciedade, no qual alterações endócrinas podem ser estudadas, a integração com centros superiores do sistema nervoso central, como por exemplo, o núcleo da Raffe (Takase & Nogueira, 2008) poderiam se aproveitar da metodologia desenvolvida pelo nosso trabalho.

Há consenso de que a homeostase energética é controlada basicamente pela circuitaria neuronal do hipotálamo ligada a mecanismos corticais responsáveis pela memória e fatores associados à motivação, situados nas regiões límbicas e do córtex cerebral. A organização integrada de tais áreas do SNC permite a constituição do ato alimentar (Ahima & Antwy, 2008). Em nosso trabalho demonstramos que variações nutricionais no início da vida se refletem no adulto, em termos da organização de seus padrões de alimentação. Ainda que restrito no estudo do padrão circadiano de alimentação, o método sonoro desenvolvido em nosso trabalho, amplia as possibilidades de estudos futuros nos quais se possa observar e analisar de forma mais integrada e com menor intervenção experimental, os aspectos biológicos da modulação do comportamento alimentar.

Conclusões

A programação metabólica, comprovada pela glicemia, insulinemia e leptinemia, e expressão diferenciada dos neuroreceptores POMC, NPY e IRS2 no ARC, também determinou o comportamento alimentar diferenciado, hiperfático e anacrônico, nos ratos sobrepeso. Este aumento de consumo se deu pelo aumento de duração das refeições.

A expressão do NPY, associada à expressão do POMC e do IRS2 no ARC, ainda que inspirem novas investigações, indicam que a regulação do apetite está associada à saciedade, em mecanismo de médio a longo prazo, visto que a expressão de POMC, e IRS2 não variou na comparação dos animais sacrificados com fome, em relação aos sacrificados em estado de saciedade. A análise de animais em momentos de refeição e de períodos maiores após as refeições, associados aos resultados aqui encontrados, podem trazer novas informações sobre a dinâmica de expressão destes neuroreceptores.

Os estudos de ritmo circadiano das refeições devem ser baseados no comportamento alimentar dos animais, visando à eliminação de variáveis indesejadas na análise dos dados. Neste aspecto, o método proposto neste trabalho, baseado no som da roída dos animais, foi comprovadamente eficiente.

A regressão a uma função senoidal dos dados de início, associados à duração das refeições, mostrou ser precisa na comparação do comportamento alimentar entre dois grupos, pois, pela análise estatística das amplitudes e comprimentos de onda, comprovou a diferença entre os animais controle e sobrepeso, já demonstrada pela análise do tamanho e intervalo entre as refeições.

O método baseado no som da roída dos animais, comprovadamente eficiente na detecção do estado de fome-saciedade dos ratos, poderá ser aplicado a diversos tipos de estudos experimentais que envolvam distúrbios alimentares.

Referências Bibliográficas

- Ahima, R. S. e D. A. Antwi. Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinol Metab Clin North Am*, v.37, n.4, Dec, p.811-23. 2008.
- Ahima, R. S., D. Prabakaran e J. S. Flier. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest*, v.101, n.5, Mar 1, p.1020-7. 1998.
- Ahima, R. S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier e J. S. Flier. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, v.382, n.6588, Jul 18, p.250-2. 1996.
- Akabayashi, A., C. T. Zaia, I. Silva, H. J. Chae e S. F. Leibowitz. Neuropeptide Y in the arcuate nucleus is modulated by alterations in glucose utilization. *Brain Res*, v.621, n.2, Sep 10, p.343-8. 1993.
- Aschoff, J. Circadian activity rhythms in hamsters and rats treated with imipramine in the drinking water. *Chronobiologia*, v.16, n.1, Jan-Mar, p.9-20. 1989.
- Bagley, D. M. e J. R. Hayes. Xenobiotic imprinting of the hepatic monooxygenase system. Effects of neonatal phenobarbital administration. *Biochem Pharmacol*, v.34, n.7, Apr 1, p.1007-14. 1985.
- Baird, J. P., N. E. Gray e S. G. Fischer. Effects of neuropeptide Y on feeding microstructure: dissociation of appetitive and consummatory actions. *Behav Neurosci*, v.120, n.4, Aug, p.937-51. 2006.
- Balthasar, N., R. Coppari, J. McMinn, S. M. Liu, C. E. Lee, V. Tang, C. D. Kenny, R. A. Mcgovern, S. C. Chua, Jr., J. K. Elmquist e B. B. Lowell. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron*, v.42, n.6, Jun 24, p.983-91. 2004.
- Barja-Fidalgo, C., E. P. Souza, S. V. Silva, A. L. Rodrigues, E. A. Anjos-Valotta, P. Sannomyia, M. S. Defreitas e A. S. Moura. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. *Inflamm Res*, v.52, n.11, Nov, p.470-6. 2003.
- Barker, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. *Bmj*, v.311, n.6998, Jul 15, p.171-4. 1995.
- Barrio Lera, J. P. [Methods for registering food intake in laboratory animals]. *Nutr Hosp*, v.14, n.6, Nov-Dec, p.231-6. 1999.
- Baskin, D. G., D. Figlewicz Lattemann, R. J. Seeley, S. C. Woods, D. Porte, Jr. e M. W. Schwartz. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res*, v.848, n.1-2, Nov 27, p.114-23. 1999.
- Benoit, S. C., E. L. Air, L. M. Coolen, R. Strauss, A. Jackman, D. J. Clegg, R. J. Seeley e S. C. Woods. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci*, v.22, n.20, Oct 15, p.9048-52. 2002.
- Bernard, S., D. Gonze, B. Cajavec, H. Herzog e A. Kramer. Synchronization-induced rhythmicity of circadian oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *PLoS Comput Biol*, v.3, n.4, Apr 13, p.e68. 2007.

Bernardis, L. L. Correlation between Lee's "Nutritive Ratio" and carcass fat content in weaning and adult female rats with ventromedial hypothalamic lesions. *J Endocr.*, v.40, p.527-28. 1968.

Berthoud, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev*, v.26, n.4, Jun, p.393-428. 2002.

Bhumbra, G. S., A. N. Inyushkin, K. Saeb-Parsy, A. Hon e R. E. Dyball. Rhythmic changes in spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Physiol*, v.563, n.Pt 1, Feb 15, p.291-307. 2005.

Bjorbaek, C., S. Uotani, B. Da Silva e J. S. Flier. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*, v.272, n.51, Dec 19, p.32686-95. 1997.

Bouret, S. G., S. J. Draper e R. B. Simerly. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci*, v.24, n.11, Mar 17, p.2797-805. 2004.

Bouret, S. G. e R. B. Simerly. Development of leptin-sensitive circuits. *J Neuroendocrinol*, v.19, n.8, Aug, p.575-82. 2007.

Broberger, C., J. Johansen, C. Johansson, M. Schalling e T. Hokfelt. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.95, n.25, Dec 8, p.15043-8. 1998.

Campfield, L. A., F. J. Smith, G. Mackie, R. Tenenbaum, M. L. Sassano, J. Mullin, K. Kaiser e R. W. Kierstead. Insulin normalization as an approach to the pharmacological treatment of obesity. *Obes Res*, v.3 Suppl 4, Nov, p.591S-603S. 1995.

Cardoso, F. R., O. C. F. A. De, D. Silva e C. M. Cortez. A simple model for circadian timing by mammals. *Braz J Med Biol Res*, v.42, n.1, Jan, p.122-7. 2009.

Chapman, I. M., E. A. Goble, G. A. Wittert, J. E. Morley e M. Horowitz. Effect of intravenous glucose and euglycemic insulin infusions on short-term appetite and food intake. *Am J Physiol*, v.274, n.3 Pt 2, Mar, p.R596-603. 1998.

Cheung, C. C., D. K. Clifton e R. A. Steiner. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*, v.138, n.10, Oct, p.4489-92. 1997.

Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. Mckee, T. L. Bauer e Et Al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, v.334, n.5, Feb 1, p.292-5. 1996.

Coppari, R., M. Ichinose, C. E. Lee, A. E. Pullen, C. D. Kenny, R. A. MCGovern, V. Tang, S. M. Liu, T. Ludwig, S. C. Chua, Jr., B. B. Lowell e J. K. Elmquist. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab*, v.1, n.1, Jan, p.63-72. 2005.

Costa, C. A. S., E. G. Alves, G. P. Gonzalez, T. B. Côrtez Barbosa, V. D. Lima, N. R., M. A. M. V., M. E. G. e C. C. A. Nascimento-Saba. Tomografia computadorizada na avaliação da distribuição do tecido adiposo abdominal de

ratos alimentados com rações hiperlipídicas após desnutrição neonatal. *Radiol Bras*, v.40, n.5, Outubro. 2007.

Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cerdan, S. Diano, T. L. Horvath, R. D. Cone e M. J. Low. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, v.411, n.6836, May 24, p.480-4. 2001.

Cruz Mezzomo, H. Programação do processo fome-saciedade de animais desnutridos no início da lactação: Papel do NPY/AgRP e POMC. (Doutorado). IBRAG - Programa de Pós-graduação em Fisiologia Clínica e Experimental, UERJ, Rio de Janeiro, 2008. 99 p.

Davidson, A. J., O. Tataroglu e M. Menaker. Circadian effects of timed meals (and other rewards). *Methods Enzymol*, v.393, p.509-23. 2005.

De Groot, M. H. e B. Rusak. Housing conditions influence the expression of food-anticipatory activity in mice. *Physiol Behav*, v.83, n.3, Dec 15, p.447-57. 2004.

De Moura, E. G. e M. C. Passos. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep*, v.25, n.3-4, Jun-Aug, p.251-69. 2005.

Dziedzic, B., J. Szemraj, J. Bartkowiak e A. Walczewska. Various dietary fats differentially change the gene expression of neuropeptides involved in body weight regulation in rats. *J Neuroendocrinol*, v.19, n.5, May, p.364-73. 2007.

Elias, C. F., C. Aschkenasi, C. Lee, J. Kelly, R. S. Ahima, C. Bjorbaek, J. S. Flier, C. B. Saper e J. K. Elmquist. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*, v.23, n.4, Aug, p.775-86. 1999.

Elias, C. F., C. Lee, J. Kelly, C. Aschkenasi, R. S. Ahima, P. R. Couceyro, M. J. Kuhar, C. B. Saper e J. K. Elmquist. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, v.21, n.6, Dec, p.1375-85. 1998.

Elmquist, J. K., C. F. Elias e C. B. Saper. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, v.22, n.2, Feb, p.221-32. 1999.

Erlanson-Albertsson, C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v.97, n.2, Aug, p.61-73. 2005.

Farley, C., J. A. Cook, B. D. Spar, T. M. Austin e T. J. Kowalski. Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats. *Obes Res*, v.11, n.7, Jul, p.845-51. 2003.

Feillet, C. A., U. Albrecht e E. Challet. "Feeding time" for the brain: a matter of clocks. *J Physiol Paris*, v.100, n.5-6, Nov-Dec, p.252-60. 2006.

Fisher, S. L., K. A. Yagaloff e P. Burn. Melanocortin-4 receptor: a novel signalling pathway involved in body weight regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v.23 Suppl 1, Feb, p.54-8. 1999.

Fleming, T. P., W. Y. Kwong, R. Porter, E. Ursell, I. Fesenko, A. Wilkins, D. J. Miller, A. J. Watkins e J. J. Eckert. The embryo and its future. *Biol Reprod*, v.71, n.4, Oct, p.1046-54. 2004.

Flier, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, v.116, n.2, Jan 23, p.337-50. 2004.

_____. Neuroscience. Regulating energy balance: the substrate strikes back. *Science*, v.312, n.5775, May 12, p.861-4. 2006.

Flier, J. S. e E. Maratos-Flier. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell*, v.92, n.4, Feb 20, p.437-40. 1998.

Friedman, J. M. e J. L. Halaas. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, v.395, n.6704, Oct 22, p.763-70. 1998.

_____. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, v.395, n.6704, Oct 22, p.763-70. 1998.

Froy, O. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol*, v.28, n.2-3, Aug-Sep, p.61-71. 2007.

Galef, B. G., Jr. Studies of social learning in Norway rats: a brief review. *Dev Psychobiol*, v.15, n.4, Jul, p.279-95. 1982.

Gamallo, J. L., M. L. Perry, V. M. Trindade, I. R. Pereira e E. A. Bernard. Effect of pre- and postnatal protein undernutrition on glycemia, ketonemia and liver glycogen concentration in suckling rats. *Ann Nutr Metab*, v.33, n.5, p.266-70. 1989.

Grove, K. L. e M. S. Smith. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav*, v.79, n.1, Jun, p.47-63. 2003.

Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei, S. L. Cohen, B. T. Chait, D. Rabinowitz, R. L. Lallone, S. K. Burley e J. M. Friedman. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, v.269, n.5223, Jul 28, p.543-6. 1995.

Halford, J. C., S. C. Wanninayake e J. E. Blundell. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacol Biochem Behav*, v.61, n.2, Oct, p.159-68. 1998.

Harder, T., A. Rake, W. Rohde, G. Doerner e A. Plagemann. Overweight and increased diabetes susceptibility in neonatally insulin-treated adult rats. *Endocr Regul*, v.33, n.1, Mar, p.25-31. 1999.

Harrold, J. A. Hypothalamic control of energy balance. *Curr Drug Targets*, v.5, n.3, Apr, p.207-19. 2004.

Higuchi, H., T. Niki e T. Shiiya. Feeding behavior and gene expression of appetite-related neuropeptides in mice lacking for neuropeptide Y Y5 receptor subclass. *World J Gastroenterol*, v.14, n.41, Nov 7, p.6312-7. 2008.

Holst, B. e T. W. Schwartz. Constitutive ghrelin receptor activity as a signaling set-point in appetite regulation. *Trends Pharmacol Sci*, v.25, n.3, Mar, p.113-7. 2004.

Honma, K., C. Von Goetz e J. Aschoff. Effects of restricted daily feeding on freerunning circadian rhythms in rats. *Physiol Behav*, v.30, n.6, Jun, p.905-13. 1983.

Itoh, S., G. Katsuura e R. Hirota. Conditioned circadian rhythm of plasma corticosterone in the rat induced by food restriction. *Jpn J Physiol*, v.30, n.3, p.365-75. 1980.

Johri, A., A. Dhawan, R. Lakhan Singh e D. Parmar. Effect of prenatal exposure of deltamethrin on the ontogeny of xenobiotic metabolizing cytochrome P450s

in the brain and liver of offsprings. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.214, n.3, Aug 1, p.279-89. 2006.

Jurgens, H. S., A. Schurmann, R. Kluge, S. Ortmann, S. Klaus, H. G. Joost e M. H. Tschop. Hyperphagia, lower body temperature, and reduced running wheel activity precede development of morbid obesity in New Zealand obese mice. *Physiol Genomics*, v.25, n.2, Apr 13, p.234-41. 2006.

Kalra, S. P. e P. S. Kalra. NPY and cohorts in regulating appetite, obesity and metabolic syndrome: beneficial effects of gene therapy. *Neuropeptides*, v.38, n.4, Aug, p.201-11. 2004.

Kaur, S., S. Thankachan, S. Begum, C. Blanco-Centurion, T. Sakurai, M. Yanagisawa e P. J. Shiromani. Entrainment of temperature and activity rhythms to restricted feeding in orexin knock out mice. *Brain Res*, v.1205, Apr 18, p.47-54. 2008.

Kennedy, G. C. The hypothalamic control of food intake in rats. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, v.137, n.889, Nov, p.535-49. 1950.

Kozak, R., S. Richy e B. Beck. Persistent alterations in neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus of rats subjected to dietary manipulation during early life. *Eur J Neurosci*, v.21, n.10, May, p.2887-92. 2005.

Kurose, Y., J. Iqbal, A. Rao, Y. Murata, Y. Hasegawa, Y. Terashima, M. Kojima, K. Kangawa e I. J. Clarke. Changes in expression of the genes for the leptin receptor and the growth hormone-releasing peptide/ghrelin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus with long-term manipulation of adiposity by dietary means. *J Neuroendocrinol*, v.17, n.6, Jun, p.331-40. 2005.

Landry, G. J. e R. E. Mistlberger. Food entrainment: methodological issues. *J Biol Rhythms*, v.22, n.6, Dec, p.484-7. 2007.

Landry, G. J., G. R. Yamakawa e R. E. Mistlberger. Robust food anticipatory circadian rhythms in rats with complete ablation of the thalamic paraventricular nucleus. *Brain Res*, v.1141, Apr 13, p.108-18. 2007.

Lax, P., S. Zamora e J. A. Madrid. Food-entrained feeding and locomotor circadian rhythms in rats under different lighting conditions. *Chronobiol Int*, v.16, n.3, May, p.281-91. 1999.

Lee, Y. J. e E. N. Benveniste. Stat1 alpha expression is involved in IFN-gamma induction of the class II transactivator and class II MHC genes. *J Immunol*, v.157, n.4, Aug 15, p.1559-68. 1996.

Madrid, J. A., F. J. Sanchez-Vazquez, P. Lax, P. Matas, E. M. Cuenca e S. Zamora. Feeding behavior and entrainment limits in the circadian system of the rat. *Am J Physiol*, v.275, n.2 Pt 2, Aug, p.R372-83. 1998.

Maffei, M., J. Halaas, E. Ravussin, R. E. Pratley, G. H. Lee, Y. Zhang, H. Fei, S. Kim, R. Lallone, S. Ranganathan e Et Al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, v.1, n.11, Nov, p.1155-61. 1995.

Makarenko, I. G., M. M. Meguid, L. Gatto, C. Chen, E. J. Ramos, C. G. Goncalves e M. V. Ugrumov. Normalization of hypothalamic serotonin (5-HT 1B) receptor and NPY in cancer anorexia after tumor resection: an immunocytochemical study. *Neurosci Lett*, v.383, n.3, Aug 5, p.322-7. 2005.

Marcelino, A. A., A. S. Moura, P. C. Barradas e F. Tenorio. Hypothalamic nuclei nitric oxide synthase expression in rats malnourished during early lactation period. *Nutr Neurosci*, v.7, n.3, Jun, p.177-84. 2004.

Meister, B. Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm*, v.59, p.265-304. 2000.

Mendoza, J., K. Drevet, P. Pevet e E. Challet. Daily meal timing is not necessary for resetting the main circadian clock by calorie restriction. *J Neuroendocrinol*, v.20, n.2, Feb, p.251-60. 2008.

Mendoza, J., C. Graff, H. Dardente, P. Pevet e E. Challet. Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci*, v.25, n.6, Feb 9, p.1514-22. 2005.

Mercer, J. G., N. Hoggard, L. M. Williams, C. B. Lawrence, L. T. Hannah, P. J. Morgan e P. Trayhurn. Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, v.8, n.10, Oct, p.733-5. 1996.

Mizuno, T. M., S. P. Kleopoulos, H. T. Bergen, J. L. Roberts, C. A. Priest e C. V. Mobbs. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes*, v.47, n.2, Feb, p.294-7. 1998.

Morimoto, Y., K. Arisue e Y. Yamamura. Relationship between circadian rhythm of food intake and that of plasma corticosterone and effect of food restriction on circadian adrenocortical rhythm in the rat. *Neuroendocrinology*, v.23, n.4, p.212-22. 1977.

Moura, A. S., C. C. Franco De Sa, H. G. Cruz e C. L. Costa. Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin. *Braz J Med Biol Res*, v.35, n.5, May, p.617-22. 2002.

Moura, A. S., C. C. Franco De Sa, C. Lopez Da Costa, L. L. Vicente, S. M. Guerreiro e A. M. Pinto. Association between nutrition and gender during lactation influencing glucose homeostasis and blood pressure of the adult offspring. *Biol Neonate*, v.82, n.4, p.263-70. 2002.

Munzberg, H. e M. G. Myers, Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci*, v.8, n.5, May, p.566-70. 2005.

Murphy, K. G. e S. R. Bloom. Gut hormones in the control of appetite. *Exp Physiol*, v.89, n.5, Sep, p.507-16. 2004.

Nih_Report. Strategic Plan for NIH OBESITY RESEARH. National Institutes of Health - U.S. Department of Health and Human Services. 2004

Niswender, K. D., D. G. Baskin e M. W. Schwartz. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*, v.15, n.8, Oct, p.362-9. 2004.

Obici, S., Z. Feng, G. Karknias, D. G. Baskin e L. Rossetti. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci*, v.5, n.6, Jun, p.566-72. 2002.

- Oomura, Y., N. Hori, T. Shiraishi, K. Fukunaga, H. Takeda, M. Tsuji, T. Matsumiya, M. Ishibashi, S. Aou, X. L. Li, D. Kohno, K. Uramura, H. Sougawa, T. Yada, M. J. Wayner e K. Sasaki. Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides*, v.27, n.11, Nov, p.2738-49. 2006.
- Paxinos, G. e C. Watson. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*: Academic Press, USA. 1998
- Pinto, S., A. G. Roseberry, H. Liu, S. Diano, M. Shanabrough, X. Cai, J. M. Friedman e T. L. Horvath. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*, v.304, n.5667, Apr 2, p.110-5. 2004.
- Plagemann, A., T. Harder, R. Lindner, K. Melchior, A. Rake, F. Rittel, W. Rohde e G. Dorner. Alterations of hypothalamic catecholamines in the newborn offspring of gestational diabetic mother rats. *Brain Res Dev Brain Res*, v.109, n.2, Aug 8, p.201-9. 1998.
- Plagemann, A., T. Harder, A. Rake, K. Melchior, F. Rittel, W. Rohde e G. Dorner. Hypothalamic insulin and neuropeptide Y in the offspring of gestational diabetic mother rats. *Neuroreport*, v.9, n.18, Dec 21, p.4069-73. 1998.
- Plagemann, A., T. Harder, A. Rake, M. Voits, H. Fink, W. Rohde e G. Dorner. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galanergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res*, v.836, n.1-2, Jul 31, p.146-55. 1999.
- Polkowska, J., M. Wankowska e A. Wojcik-Gladysz. Expression of NPY-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the cycling ewe. *Folia Histochem Cytobiol*, v.44, n.1, p.13-6. 2006.
- Polkowska, J., A. Wojcik-Gladysz e M. Wankowska. The effect of intracerebroventricular infusions of leptin on the immunoreactivity of neuropeptide Y and gonadotrophin releasing hormone neurons in the hypothalamus of prepubertal sheep in conditions of short fasting. *J Chem Neuroanat*, v.32, n.1, Aug, p.65-73. 2006.
- Pompeu, T. G. *Corpo Humano e a Alienação Estética no Nosso Tempo*. *Cadernos de Psicologia (PUC-MG)*, v.6, 1999, p.82-90. 1999.
- Porte, D., Jr., D. G. Baskin e M. W. Schwartz. Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev*, v.60, n.10 Pt 2, Oct, p.S20-9; discussion S68-84, 85-7. 2002.
- Poulin, A. M. e E. Timofeeva. The dynamics of neuronal activation during food anticipation and feeding in the brain of food-entrained rats. *Brain Res*, v.1227, Aug 28, p.128-41. 2008.
- Proulx, K., D. Richard e C. D. Walker. Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology*, v.143, n.12, Dec, p.4683-92. 2002.
- Ramos, E. J., I. V. Romanova, S. Suzuki, C. Chen, M. V. Ugrumov, T. Sato, C. G. Goncalves e M. M. Meguid. Effects of omega-3 fatty acids on orexigenic and anorexigenic modulators at the onset of anorexia. *Brain Res*, v.1046, n.1-2, Jun 7, p.157-64. 2005.

- Remmers, F., M. Fodor e H. A. Delemarre-Van De Waal. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake. *Physiol Behav*, v.95, n.1-2, Sep 3, p.208-15. 2008.
- Remmers, F., L. A. Verhagen, R. A. Adan e H. A. Delemarre-Van De Waal. Hypothalamic neuropeptide expression of juvenile and middle-aged rats after early postnatal food restriction. *Endocrinology*, v.149, n.7, Jul, p.3617-25. 2008.
- Rodrigues, A. L. Efeito da Superalimentação na lactação sobre a regulação da composição corporal, homeostase glicêmica, perfil lipídico, função tireoideana e sinalização da leptina em ratos jovens e adultos. (Doutorado). Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, UERJ, Rio de Janeiro, 2008. 99 p.
- Rodrigues-Cunha, A. C. S., R. O. Pereira, M. J. S. Pereira, V. De Melo Soares, M. R. Martins, M. Teixeira Teixeira, E. P. Souza e A. S. Moura. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion - the role of GLUT-2. *J Nutr Biochem*, Jun 2009.
- Roenneberg, T., E. J. Chua, R. Bernardo e E. Mendoza. Modelling biological rhythms. *Curr Biol*, v.18, n.17, Sep 9, p.R826-R835. 2008.
- Rohner-Jeanrenaud, E. e B. Jeanrenaud. Central nervous system and body weight regulation. *Ann Endocrinol (Paris)*, v.58, n.2, p.137-42. 1997.
- Rosenwasser, A. M., R. J. Pelchat e N. T. Adler. Memory for feeding time: possible dependence on coupled circadian oscillators. *Physiol Behav*, v.32, n.1, Jan, p.25-30. 1984.
- Saladin, R., P. De Vos, M. Guerre-Millo, A. Leturque, J. Girard, B. Staels e J. Auwerx. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*, v.377, n.6549, Oct 12, p.527-9. 1995.
- Sanchez, E., P. S. Singru, R. Acharya, M. Bodria, C. Fekete, A. M. Zavacki, A. C. Bianco e R. M. Lechan. Differential effects of refeeding on melanocortin-responsive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, v.149, n.9, Sep, p.4329-35. 2008.
- Schibler, U., J. Ripperger e S. A. Brown. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms*, v.18, n.3, Jun, p.250-60. 2003.
- Sederholm, F., A. A. Ammar e P. Sodersten. Intake inhibition by NPY: role of appetitive ingestive behavior and aversion. *Physiol Behav*, v.75, n.4, Apr 1, p.567-75. 2002.
- Serra, G. M. A. Saúde e nutrição na adolescência: o discurso sobre dietas na Revista Capricho. (Mestrado). Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001. 136 p.
- Sheward, W. J., E. S. Maywood, K. L. French, J. M. Horn, M. H. Hastings, J. R. Seckl, M. C. Holmes e A. J. Harmar. Entrainment to feeding but not to light: circadian phenotype of VPAC2 receptor-null mice. *J Neurosci*, v.27, n.16, Apr 18, p.4351-8. 2007.
- Shioda, S., F. Takenoya, M. Yagi, L. Wang, Y. Hori e H. Kageyama. Neural networks of several novel neuropeptides involved in feeding regulation. *Nutrition*, v.24, n.9, Sep, p.848-53. 2008.
- Sichieri, R., D. C. Coutinho, J. B. Monteiro e W. F. Coutinho. Recomendações de Alimentação e Nutrição

Saudável para a População Brasileira. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.44, n.3. 2000.

Sidlo, J., M. Zaviacic e P. Kvasnicka. Night and day differences in the food-intake of laboratory rats Wistar and Koletsky strains. *Bratisl Lek Listy*, v.96, n.12, Dec, p.655-7. 1995.

Simerly, R. B. Hypothalamic substrates of metabolic imprinting. *Physiol Behav*, v.94, n.1, Apr 22, p.79-89. 2008.

Sladek, M., M. Rybova, Z. Jindrakova, Z. Zemanova, L. Polidarova, L. Mrnka, J. O'Neill, J. Pacha e A. Sumova. Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, v.133, n.4, Oct, p.1240-9. 2007.

Smith, M. S. e K. L. Grove. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Front Neuroendocrinol*, v.23, n.3, Jul, p.225-56. 2002.

Sullivan, S. A. e L. L. Birch. Infant dietary experience and acceptance of solid foods. *Pediatrics*, v.93, n.2, Feb, p.271-7. 1994.

Takase, L. F. e M. I. Nogueira. Patterns of fos activation in rat raphe nuclei during feeding behavior. *Brain Res*, v.1200, Mar 20, p.10-8. 2008.

Tallett, A. J., J. E. Blundell e R. J. Rodgers. Endogenous opioids and cannabinoids: system interactions in the regulation of appetite, grooming and scratching. *Physiol Behav*, v.94, n.3, Jun 9, p.422-31. 2008.

Tartaglia, L. A. The leptin receptor. *J Biol Chem*, v.272, n.10, Mar 7, p.6093-6. 1997.

Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Wool, C. A. Monroe e R. I. Tepper. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, v.83, n.7, Dec 29, p.1263-71. 1995.

Thim, L., P. Kristensen, P. J. Larsen e B. S. Wulff. CART, a new anorectic peptide. *Int J Biochem Cell Biol*, v.30, n.12, Dec, p.1281-4. 1998.

Turek, F. W., C. Joshu, A. Kohsaka, E. Lin, G. Ivanova, E. McDearmon, A. Laposky, S. Losee-Olson, A. Easton, D. R. Jensen, R. H. Eckel, J. S. Takahashi e J. Bass. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*, v.308, n.5724, May 13, p.1043-5. 2005.

Vaisse, C., J. L. Halaas, C. M. Horvath, J. E. Darnell, Jr., M. Stoffel e J. M. Friedman. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet*, v.14, n.1, Sep, p.95-7. 1996.

Valassi, E., M. Scacchi e F. Cavagnini. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, v.18, n.2, Feb, p.158-68. 2008.

Van Dijk, G. e J. H. Strubbe. Time-dependent effects of neuropeptide Y infusion in the paraventricular hypothalamus on ingestive and associated behaviors in rats. *Physiol Behav*, v.79, n.4-5, Sep, p.575-80. 2003.

Vige, A., C. Gallou-Kabani e C. Junien. Sexual dimorphism in non-Mendelian inheritance. *Pediatr Res*, v.63, n.4, Apr, p.340-7. 2008.

Wang, J. H., F. Wang, M. J. Yang, D. F. Yu, W. N. Wu, J. Liu, L. Q. Ma, F. Cai e J. G. Chen. Leptin regulated calcium channels of neuropeptide Y and

proopiomelanocortin neurons by activation of different signal pathways. *Neuroscience*, v.156, n.1, Sep 22, p.89-98. 2008.

Waterland, R. A. e C. Garza. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*, v.69, n.2, Feb, p.179-97. 1999.

Wauters, M., R. V. Considine e L. F. Van Gaal. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol*, v.143, n.3, Sep, p.293-311. 2000.

Wilding, J. P. Neuropeptides and appetite control. *Diabet Med*, v.19, n.8, Aug, p.619-27. 2002.

Williams, G., C. Bing, X. J. Cai, J. A. Harrold, P. J. King e X. H. Liu. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav*, v.74, n.4-5, Nov-Dec, p.683-701. 2001.

Woods, S. C., D. P. Figlewicz, L. Madden, D. Porte, Jr., A. J. Sipols e R. J. Seeley. NPY and food intake: discrepancies in the model. *Regul Pept*, v.75-76, Sep 25, p.403-8. 1998.

Wynne, A. M., M. M. Mocanu e D. M. Yellon. Pioglitazone mimics preconditioning in the isolated perfused rat heart: a role for the prosurvival kinases PI3K and P42/44MAPK. *J Cardiovasc Pharmacol*, v.46, n.6, Dec, p.817-22. 2005.

Wynne, K., A. J. Park, C. J. Small, M. Patterson, S. M. Ellis, K. G. Murphy, A. M. Wren, G. S. Frost, K. Meeran, M. A. Ghatei e S. R. Bloom. Subcutaneous oxyntomodulin reduces body weight in overweight and obese subjects: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes*, v.54, n.8, Aug, p.2390-5. 2005.

Wynne, K., S. Stanley, B. MCGowan e S. Bloom. Appetite control. *J Endocrinol*, v.184, n.2, Feb, p.291-318. 2005.

Yi, C. X., J. Van Der Vliet, J. Dai, G. Yin, L. Ru e R. M. Buijs. Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology*, v.147, n.1, Jan, p.283-94. 2006.

Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold e J. M. Friedman. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, v.372, n.6505, Dec 1, p.425-32. 1994.

ANEXO I – Ficha de Registro do Experimento XLV. Ao lado do peso inicial dos animais, a anotação E ou D indicaram a gaiola da Esquerda ou Direita em que o animal foi confinado para a gravação dos experimentos

EXPERIMENTO XLV INICIO 2/7 OBS:
 Peso Inicial Controle - 320,0 E
 Peso Inicial Obeso - 480,0 D

Anim:	Dia	Peso	Ração			Filme	OBS
			8:00 hs	12:00 hs	18:00 hs		
C	2/7				300,0		
O	2/7				300,0		
C	3/7	284,0			278,9	K	16,0!
O	3/7	273,5			268,8		26,5!
C	4/7	268,9			262,2	L	10!
O	4/7	249,9			243,0		20!
C	5/7	244,7			239,1	M	18!
O	5/7	221,2			214,3		22!
C	6/7	226,0					13
O	6/7	192,4					22!
C	7/7				192,5	N	
O	7/7				154,3		
C	8/7	179,6			175,6	O	13
O	8/7	133,2			130,4		21
C	9/7	161,0			154,8	P	14* VÍDEO COM FÓTIOS DEPOIS
O	9/7	107,0			100,8		3* SOM DIREITA SÓ ATÉ 2:00h
C	10/7	135,2			131,8	Q	
O	10/7	80,4			73,3		
C	11/7	115,4			111,1		SACRIFÍCIO
O	11/7	52,7					
C							
O							
C							
O							
C							
O							
C							
O							

XLV

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)