

UNIVERSIDADE PAULISTA

**MODELO DE HIPERNUTRIÇÃO NEONATAL INDUZ
SOBREPESO, COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO
E AUMENTA OS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-1 β
NA IDADE PRÉ-PÚBERE DE RATOS**

ANA CLAUDIA SILVA SAMPAIO

SÃO PAULO

2020

UNIVERSIDADE PAULISTA

**MODELO DE HIPERNUTRIÇÃO NEONATAL INDUZ
SOBREPESO, COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO
E AUMENTA OS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-1 β
NA IDADE PRÉ-PÚBERE DE RATOS**

ANA CLAUDIA SILVA SAMPAIO

**SÃO PAULO
2020**

RESUMO

MODELO DE HIPERNUTRIÇÃO NEONATAL INDUZ SOBREPESO, COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E AUMENTA OS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-1 β NA IDADE PRÉ-PUBERE DE RATOS

Ana Claudia Silva Sampaio

Orientadora: Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

O crescente aumento do sobrepeso e obesidade é um evento epidêmico global, acometendo principalmente crianças, e tem-se como um dos maiores desafios de saúde pública do século 21. Durante o desenvolvimento, a plasticidade do seu organismo é alta e intervenções neste período podem ter efeitos permanentes. Nesse sentido, a dieta na infância é um fator que pode modificar diferentes aspectos do desenvolvimento. Logo, a observação de sinais precoces advindos dessas alterações pode contribuir para o conhecimento de prejuízos em períodos mais tardios da vida. Desta forma, o objetivo deste trabalho pauta-se em estudar os efeitos da hipernutrição neonatal em um modelo de redução da ninhada, no desenvolvimento, comportamento e em parâmetros bioquímicos e morfológicos da prole masculina de ratas na idade pré-púbere. Para isso, as ninhadas do grupo experimental, denominado grupo hipernutrição (GH) foram reduzidas a 4 animais (3 machos e 1 fêmea) para induzir a hipernutrição e as ninhadas do grupo controle (GC) foram padronizadas com 8 animais (4 machos e 4 fêmeas).

Palavras-chave: Redução da ninhada. Desenvolvimento pós-natal. Adiposidade. Teste de natação forçada. Citocinas.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA – CAPÍTULO I.....	16
2.1 Obesidade.....	16
2.2 Controle alimentar.....	17
2.3 Controle neural da ingestão energética.....	19
2.4 Tecido adiposo.....	20
2.5 Fatores que influenciam no sobrepeso e na obesidade.....	24
2.5.1 Fatores gastrointestinais.....	24
2.5.2 Fatores genéticos e epigenéticos.....	24
3 REVISÃO DE LITERATURA – CAPÍTULO II.....	26
3.1 Obesidade infantil.....	26
3.2 Modelos de obesidade infantil.....	29
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivos gerais.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1 Animais.....	31
5.2 Diagnóstico da prenhez.....	31
5.3 Formação dos grupos.....	32
5.4 Estudos maternos.....	32
5.4.1 Comportamento maternal.....	32
5.5 Estudos com a prole.....	34
5.5.1 Avaliação do ganho de massa corporal e índice de Lee.....	34
5.5.2 Avaliação do desenvolvimento físico, reflexológico e motor.....	34
5.5.3 Avaliação do desenvolvimento reflexológico e motor.....	35
5.5.4 Atividade geral em campo aberto.....	36
5.5.5 Teste de transição claro-escuro.....	37
5.5.6 Teste de natação forçada.....	39
5.5.7 Peso das gorduras.....	40
5.6 Avaliações bioquímicas.....	40
5.7 Delineamento experimental.....	41
5.8 Análise estatística.....	42
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, o sobrepeso e a obesidade cresceram mundialmente em proporções consideradas epidêmicas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (1) (2). A obesidade é definida, pela OMS, como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que apresenta risco à saúde (3), e é classificada em níveis distintos entre adultos e crianças (4). Estudos realizados em 2010 evidenciaram que o sobrepeso e a obesidade causaram 3,4 milhões de mortes e, entre os anos de 1983 e 2013, sua prevalência aumentou 27,5% em adultos e 47,1% em crianças (5).

Atualmente a obesidade é um distúrbio que afeta um terço da população mundial e estima-se que em 2030, caso esse índice continue a crescer, 38% da população mundial adulta será considerada com sobrepeso e 20% será classificada como obesa (6).

O sobrepeso e a obesidade são distúrbios considerados fatores predisponentes para outras doenças como diabetes tipo 2 (7), hipertensão (8), cardiopatias (9), doenças respiratórias (10), diferentes tipos de câncer (11), distúrbios endócrinos (12), distúrbios psiquiátricos (13), além de provocarem alterações na resposta imune (14), afetando assim, a qualidade de vida dos indivíduos e aumentando os índices de mortalidade (15).

Na obesidade, o crescimento do tecido adiposo está associado ao desenvolvimento de uma inflamação crônica de baixo grau, devido à infiltração de células imunes ativadas e ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (16). À medida que um indivíduo ganha peso, ocorre, paralelamente, aumento no número de adipócitos, havendo alterações celulares e moleculares no tecido adiposo que afetam o metabolismo de forma sistêmica. O tecido adiposo aumenta a produção de macrófagos, com o intuito de eliminar os adipócitos em excesso (17), bem como sintetiza uma série de citocinas pró e anti-inflamatórias, denominadas adipocinas, como a leptina, a adiponectina, a resistina, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6), além de quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (18).

Segundo a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (19), a Síndrome Metabólica (SM) é um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares usualmente

relacionados à deposição central de gordura e à resistência à insulina, e é caracterizada por inflamação crônica de baixo-grau (20).

Desta forma, obesidade está associada à síndrome metabólica e essa associação é atribuída ao processo inflamatório que ambas promovem no organismo acometendo órgãos como pâncreas, fígado, tecido muscular esquelético, coração, articulações e sistema nervoso central (SNC) (21).

Em relação à obesidade infantil, esta é considerada um dos maiores desafios de saúde pública do século 21 e sua prevalência cresce em um ritmo ameaçador (22). Estudos epidemiológicos mostraram que, em 2016, 50 milhões de meninas e 74 milhões de meninos em todo o mundo foram considerados com sobrepeso ou obesos (23). São descritas na literatura inúmeras consequências da obesidade infantil, que podem ser imediatas, de médio e de longo prazo (24), como comorbidades, complicações endócrinas, cardiovasculares, gastrointestinais, pulmonares, ortopédicas, neurológicas, dermatológicas, síndromes genéticas e psicossociais (25) (26).

Durante o período de desenvolvimento, a plasticidade do organismo é alta e intervenções durante este período podem ter efeitos permanentes. A dieta na infância é um fator que pode modificar diferentes aspectos do desenvolvimento e a observação de sinais precoces em razão dessas alterações pode amenizar prejuízos em períodos mais tardios da vida (27).

Neste sentido, modelos animais para o estudo da obesidade na infância podem ser úteis para compreender as consequências da obesidade nesta fase e em períodos mais tardios da vida. A maioria dos trabalhos com modelos experimentais de obesidade infantil relata seus efeitos na idade adulta (28) (29) (30) (31) (32). No entanto, estudos na idade pré-púbere a respeito dos efeitos da hipernutrição no período neonatal, investigando parâmetros do desenvolvimento físico, reflexológico e motor, na adiposidade, no comportamento e nos níveis séricos de citocinas e hormônios ainda não são descritos na literatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA – CAPÍTULO I

2.1 Obesidade

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal no indivíduo (3) e é considerada fator de risco para uma série de doenças. O obeso tem maior propensão a desenvolver problemas tal como hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, entre outras (33). Além disso, a adiposidade total e o acúmulo de gordura subcutânea troncular durante a adolescência estão positivamente e independentemente associados à aterosclerose na idade adulta (34). O acúmulo central de gordura corporal está associado à resistência à insulina, enquanto a distribuição de gordura corporal em um padrão periférico é metabolicamente menos importante (35). O efeito da obesidade mórbida sobre a mortalidade é maior entre os mais jovens do que entre os adultos mais velhos e também está associada ao aumento do risco de vários tipos de câncer (11,36,37).

Desta forma, a mensuração da composição corporal é uma ferramenta extremamente útil para avaliar o estado nutricional e a capacidade funcional do corpo humano (38). Existem diferentes métodos para este fim que apresentam vantagens e desvantagens, tal como a absorciometria de dupla energia por raios X (AXDE), impedância bioelétrica (BIA), tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM), medida de espessuras das dobras cutâneas, entre outros (39). Contudo, devido à facilidade de cálculo, baixo custo, por não precisarem de um alto nível de conhecimento técnico e, sobretudo, por não serem invasivas, as medidas antropométricas são comumente utilizadas em estudos clínicos e epidemiológicos (38).

Entre essas, o índice de massa corpórea (IMC) é a medida antropométrica mais utilizada na classificação da obesidade e é definido como o peso dividido pela altura ao quadrado (kg/m^2) (2,40,41). O IMC foi denominado primeiramente por índice de Quetelet em homenagem ao astrônomo, matemático e sociólogo belga Lambert Adolphe Jacques Quetelet, que no século 19 observou a relação entre o peso e a altura ao quadrado de adultos (42). Contudo, certas limitações tornam o IMC uma medida não tão segura para se definir sobrepeso e obesidade. Indivíduos com musculatura desenvolvida terão um IMC elevado mesmo sem possuir uma

maior quantidade de gordura corporal

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define o IMC para adultos a partir de 20 anos da seguinte forma: indivíduos com IMC abaixo de 18.5 são considerados abaixo do peso, indivíduos com IMC entre 18.5 e 24.9 são considerados com peso normal, IMC igual ou acima de 25.0 definem os indivíduos como acima do peso ou pré-obesidade e IMC igual ou acima de 30 categorizam indivíduos como obesos (IMC entre 30.0 – 34.9 = obesidade classe I; IMC 35.0 – 39.9 = obesidade classe II; IMC igual ou acima de 40 = obesidade classe III) (43).

Entre crianças e adolescentes, as definições de sobrepeso e obesidade tornam-se mais difíceis em função das características de cada idade. Segundo a OMS (44), a avaliação do estado nutricional em crianças e adolescentes leva em conta um conjunto maior de parâmetros. Além da análise do IMC que é feita de acordo com a idade, fatores como estatura para idade, peso em relação à estatura e o peso em relação à idade são importantes, bem como deve ser considerada a faixa etária. Além disto, a avaliação do peso em crianças menores de 10 anos é mais complexa, pois emprega diferentes indicadores entre faixas etárias (0 a 2 anos, 2 a 5 anos e 5 a 10 anos).

Uma pesquisa realizada pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), de 2018, do Ministério da Saúde, (45) mostrou que houve aumento de 67,8% nos últimos treze anos da obesidade e sobrepeso, elevando-se de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018. Em 2018, os dados também apontaram que o crescimento da obesidade foi maior entre os adultos de 25 a 34 anos e 35 a 44 anos, com 84,2% e 81,1% de incremento, respectivamente. Apesar do excesso de peso ser mais comum entre os homens; em 2018, as mulheres apresentaram obesidade ligeiramente maior que a dos homens, com 20,7% nas mulheres em relação à 18,7% nos homens.

2.2 Controle alimentar

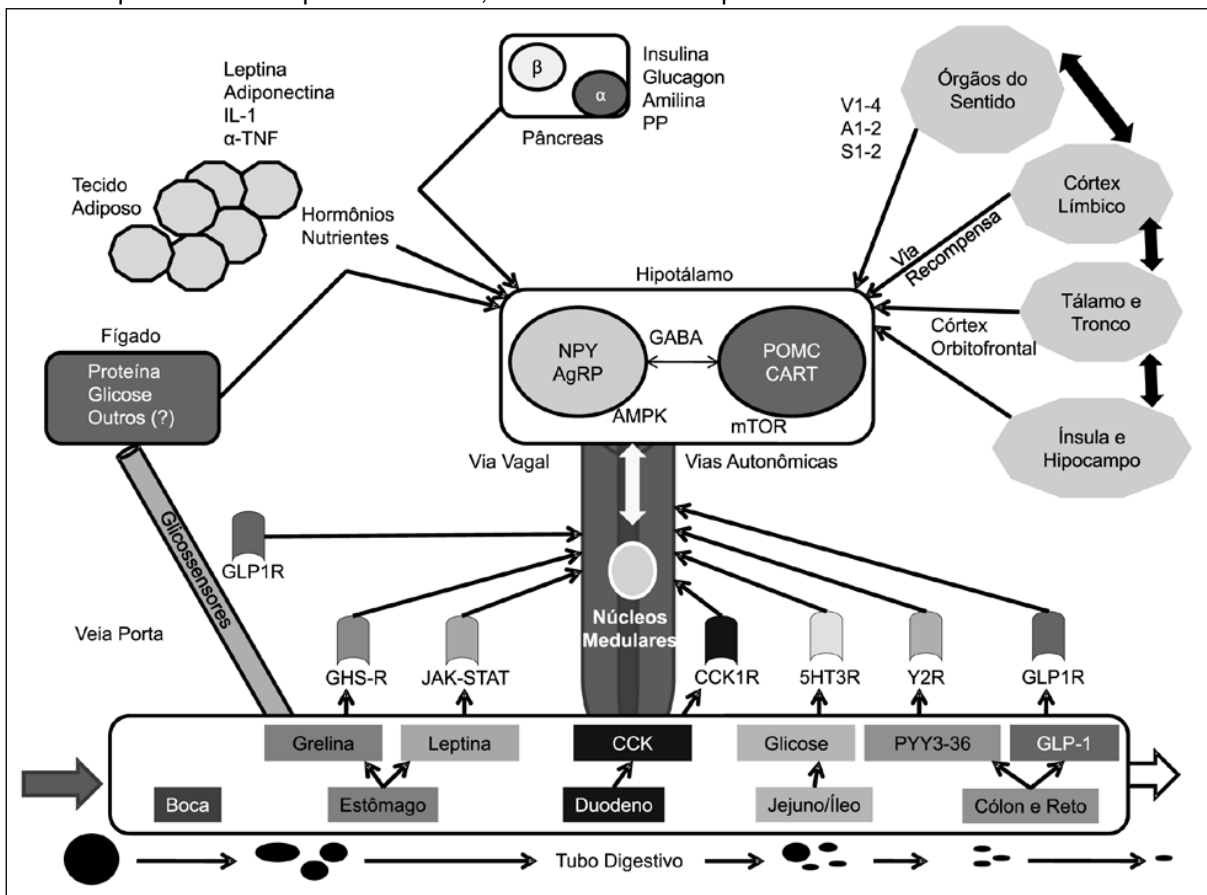
O peso corporal é regulado por um sistema complexo que coordena a ingestão de alimentos e o gasto de energia. O sistema alimentar visa o armazenamento energético e, para tanto, um organismo apresenta sistemas integrados que recebem sinais aferentes desde o sistema digestório passando pelo tecido adiposo e chegando às estruturas centrais. Este controle determina a

resposta comportamental, autonômica e endócrina frente ao alimento, levando ao aumento ou redução da ingestão alimentar e inversamente ao gasto energético (46).

Por meio de quimiorreceptores e mecanorreceptores, o sistema digestório sinaliza para o nervo vago sobre o grau de nutrientes nele presente, estabelecendo uma comunicação importante entre intestino-cérebro (47). Hormônios como a grelina, a colecistocinina (CCK), o peptídeo YY (PYY) e o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) regulam também o apetite e enviam informações aos sistemas neurais centrais envolvidos com o controle alimentar. Ainda, o fígado, o pâncreas e os músculos enviam informações ao encéfalo sobre a situação de nutrientes, em particular dos níveis de gordura e glicose (48).

O hipotálamo, particularmente o núcleo arqueado, é a maior área de integração entre os diversos sinais oriundos da periferia e do tronco cerebral, determinando ações que visam adequar o balanço energético do organismo. Regiões mais altas do sistema nervoso central, como dos órgãos dos sentidos, córtex límbico, tálamo e tronco cerebral e da insula, enviam informações ao hipotálamo fechando um circuito do controle alimentar (49). A Figura 1 ilustra as relações entre todos estes sistemas, tecidos e áreas do sistema nervoso central.

Figura 1 – Comunicação do sistema gastrointestinal e cérebro no controle alimentar. NTS = núcleo do trato solitário; NPB = núcleo parabraquial; VTA = área tegumentar ventral; CART = transcritos relacionados à cocaína e anfetamina; MCH = hormônio concentrador de melanócitos; CRH = hormônio liberador de corticotrofina; TRH = hormônio liberador de tireotrofina; ADH = hormônio antidiurético; OXT = ocitocina; NPY = neuropeptídeo Y; AgRP = peptídeo relacionado ao gene Agouti; MC3R = receptor de melanocortina 3; MC4R = receptor de melanocortina 4; ACh = acetilcolina; NA = noradrenalina; 5HT = serotonina; MSH = hormônio melanotrófico; GABA = ácido gama amino butírico; AMPK = quinase ativada por AMPcíclico; mTOR = alvo da rapamicina em mamíferos



Fonte: Damiani, 2011.

Diante de tal complexidade, torna-se importante um olhar mais detalhado sobre alguns destes fatores que estão relacionados ao controle alimentar para se compreender os fenômenos da obesidade e sobrepeso.

2.3 Controle neural da ingestão energética

A ingestão de alimentos difere entre os indivíduos por diversos fatores que vão desde a composição e quantidade do que é ingerido a variáveis como comportamento, condição social, custo, entre outros. Além disto, não está correlacionada diretamente com o gasto energético diário. Apesar das diferenças entre as refeições diárias individuais, a relação entre o que é ingerido com o que é

gasto, denominada homeostase energética, geralmente ocorre de maneira equilibrada quando observada por um intervalo que engloba diversas refeições (50). Contudo, o controle fisiológico da manutenção do equilíbrio energético é complexo e resulta da integração entre sinais neurais, nutricionais, sendo influenciado por diversos fatores como mecanismos comportamentais, sensoriais, autonômicos, nutricionais e endócrinos (51). O sistema nervoso central possui extrema relevância em relação à homeostase energética, sendo o hipotálamo a principal região envolvida no controle do apetite (49,52). É nesta área cerebral que ocorre o processamento de sinais aferentes do intestino e tronco cerebral, bem como sinais eferentes, responsáveis pelo controle da ingestão alimentar. Internamente, o hipotálamo possui diversos núcleos e circuitos neuronais responsáveis pelo controle do apetite (51). Principalmente no núcleo arqueado, porém não restrito a esta área, existem duas populações neuronais que atuam de maneira antagônica no controle da ingestão energética. Um grupo é composto pelo neuropeptídeo Y (NPY) e pelo peptídeo relacionado à agouti (AgRP) que expressa neurônios AgRP/NPY com características orexígenas, ou seja, que favorecem a ingestão de alimentos e o outro co-expressa pró-opiomelanocortina (POMC) e transcritos relacionados à anfetamina e cocaína (CART). A POMC é precursora para o hormônio estimulante de alfa-melanócitos (alfa-MSH) , que atua na diminuição da ingestão de alimentos (49,51,53).

2.4 Tecido adiposo

O tecido adiposo é composto predominantemente por adipócitos, linfócitos, macrófagos, fibroblastos e células vasculares, classificado em dois tipos funcionalmente distintos: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). Há também um tipo de gordura denominada “gordura bege”, presente no TAB, que ao ser submetida a determinados estímulos, adquire um fenótipo de tecido adiposo marrom. O TAB é responsável pelo armazenamento do excesso de energia na conformação de triacilgliceróis, enquanto o TAM e a gordura bege possuem alta atividade metabólica e realizam termogênese, sendo responsáveis pela homeostase da temperatura corporal, homeostase energética e controle do peso corporal. Como um todo, são funções do tecido adiposo: adipogênese, metabolismo lipídico, síntese ou secreção de adipocinas e termogênese (54–57).

Além de ser um reservatório energético, o tecido adiposo é considerado um órgão endócrino capaz de sintetizar e secretar inúmeras citocinas, denominadas adipocinas, que atuam de maneira autócrina, parácrina e endócrina (58). Foram identificadas mais de 50 adipocinas responsáveis por regular o metabolismo, o consumo energético e o armazenamento de gordura (59). Contudo, são reconhecidas como adipocinas clássicas, secretadas pelo tecido adiposo branco (TAB): a adiponectina, leptina, a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α) (57).

A adiponectina, também conhecida como proteína relacionada ao complemento adipocitário de 30 kDa (Acrp30), adipoQ e proteína de ligação à gelatina de 28 kDa (GBP28), é um polipeptídeo de 244 aminoácidos, secretada principalmente por adipócitos, mas que pode ser sintetizada em menores quantidades por cardiomiócitos, hepatócitos e placenta (60,61). O gene da adiponectina, APM1 (transcrição mais abundante do gene adiposo1), encontra-se no cromossomo 3 na região 3q27 e foi descrito pela primeira vez em 1995 (58,62). A concentração de adiponectina é maior no tecido adiposo subcutâneo do que no tecido adiposo visceral e os níveis plasmáticos em humanos variam de 3-30 μ g/ml (58,63). A literatura descreve que os níveis circulantes de adiponectina possuem uma correlação inversa com o risco para a obesidade e doenças cardiovasculares. Enquanto níveis baixos, denominados de hipoadiponectinemia, estão relacionados com resistência à insulina, à hiperinsulinemia, à diabetes tipo 2, à doença coronariana e à hipertensão arterial, níveis mais altos são encontrados com a redução do peso (60,61,63). A adiponectina possui dois receptores, sendo eles o receptor 1 (ADP-R1), expresso principalmente no músculo, e receptor 2 (ADP-R2), expresso principalmente no fígado. O ADP-R1 possui alta afinidade por adiponectina globular e baixa afinidade por adiponectina de comprimento total. Já o ADP-R2 possui afinidade intermediária para as duas formas. Sendo assim, os efeitos biológicos da adiponectina dependem tanto de sua concentração plasmática quanto da expressão tecidual de seus receptores (58,60).

A leptina foi descrita a primeira vez em 1994, como resultado de uma mutação genética no gene Lep ou Ob de ratos obesos, localizado no cromossomo 7q31.3. É uma proteína que em sua forma inativa possui 167 aminoácidos, e sua forma ativa possui 146 aminoácidos (64). Os níveis de leptina são diretamente proporcionais à massa do tecido adiposo e à concentração de insulina, e sua expressão é maior no

tecido subcutâneo do que no tecido adiposo visceral (58). Além de ser sintetizada no tecido adiposo branco, pode ser sintetizada pela placenta, adeno-pituitária, mucosa gástrica, músculo esquelético e epitélio mamário. Os níveis de leptina podem ser influenciados por fatores metabólicos e endócrinos. Glicocorticoides, estrogênios, citocinas e infecções aumentam sua concentração, enquanto temperaturas mais baixas, estimulação adrenérgica, hormônios tireoidianos e do crescimento (GH), andrógenos, melatonina e fumo a diminuem (60). Existem receptores de leptina tanto no sistema nervoso central como em tecidos periféricos. Ao todo são seis isoformas codificadas pelo gene LEPR e pertencentes à família de receptores de citocinas classe I. No cérebro, são encontrados receptores LEPR-b para a leptina principalmente na região do hipotálamo (64,65). A leptina é caracterizada por agir tanto como um hormônio, atuando na regulação da homeostase energética e influenciando funções endócrinas e metabolismo ósseo, quanto uma citocina, promovendo resposta inflamatória, demonstrando que não possui uma ou outra característica, mas que funciona como um mecanismo de sinalização responsável por regular diversas funções biológicas (65,66). Em relação à homeostase energética, no núcleo arqueado do hipotálamo, a leptina estimula a expressão dos neuropeptídeos POMC e CART, responsáveis por induzir inibição da ingestão de alimentos, aumentar o gasto energético, e inibir a expressão do neuropeptídeo Y e peptídeo relacionado à agouti (AgRP).

O fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) é uma citocina pró-inflamatória e imunomoduladora que atua na inflamação, apoptose, citotoxicidade, produção de outras citocinas e induz resistência à insulina na obesidade (60). É sintetizado principalmente por macrófagos e linfócitos. No tecido adiposo, é produzido em quantidades menores por adipócitos e células estroma-vasculares (58,67). Primeiramente, foi descrito como um fator responsável pela necrose tumoral e mais tarde associado à caquexia. Possui dois receptores, sendo eles o TNF-alfa tipo I (TNFR1) e o TNF-alfa tipo II (TNFR2) (68). Seus níveis aumentam na obesidade e correlacionam-se positivamente ao índice de massa corporal (IMC), ao conteúdo do seu RNAm e ao volume dos adipócitos. O $\text{TNF-}\alpha$ relaciona-se à resistência à insulina por meio dos seguintes mecanismos: aceleração da lipólise, aumento dos ácidos graxos livres (AGL) na circulação, redução da síntese de GLUT4 e expressão de insulina e do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) (60)

A IL-6 é uma citocina com capacidade pró-inflamatória e anti-inflamatória (59).

No tecido adiposo, tanto sua expressão quanto a de seu receptor (IL-6R) são realizadas por adipócitos e pela matriz celular do tecido adiposo, e seus níveis são mais elevados no tecido adiposo visceral em relação ao tecido adiposo subcutâneo. A concentração de IL-6 na circulação e sua expressão no tecido adiposo estão positivamente correlacionadas com a obesidade, resistência à insulina e intolerância à glicose (58). Os níveis de IL-6 são altos em indivíduos com diabetes tipo 2 bem como na síndrome metabólica e correlacionam-se positivamente com o índice de massa corporal (IMC) (69). Ela é responsável por diminuir a sinalização de insulina em tecidos periféricos, inibir a adipogênese bem como a secreção de adiponectina. Contudo, os níveis de IL-6 no sistema nervoso central (SNC) encontram-se diminuídos na obesidade (58).

A interleucina 1 (IL-1) é uma citocina pró-inflamatória protípica que atua como principal regulador de processos inflamatórios citada pela primeira vez na literatura no ano de 1984 (70–72). Possui duas isoformas, IL-1 alpha (IL-1 α) e IL-1 beta (IL-1 β), que podem ser expressas por diferentes tipos de células de origem hematopoiética e não-hematopoiética e, apesar de distinguirem em sua sequência de aminoácidos, estruturalmente e biologicamente possuem funções similares incluindo gerar inúmeras respostas biológicas que surtem efeitos no sistema nervoso central e sistemas hematológico e metabólico. Além disto, compartilham o mesmo receptor (70,73–75).

Tanto IL-1 α quanto IL-1 β são expressas em diversos tecidos e células linfoides (macrófagos teciduais em órgãos como timo, baço, medula óssea, entre outros) e não linfoides (macrófagos teciduais presentes no pulmão, fígado e trato digestivo). Ademais, são sintetizadas por adipócitos (74,76).

São encontrados na literatura dados que comprovam o aumento dos níveis sérios das duas isoformas de IL-1 em seres humanos e ratos obesos. Relacionado à IL-1 α , estudos *invitro* sugeriram que ela pode inibir a diferenciação adipocitária e reduz a sinalização de insulina nos adipócitos de camundongos. Por sua vez, IL-1 β é uma citocina amplamente encontrada no plasma. Em 2003 foi descrito pela primeira vez que os níveis plasmáticos de IL-1 β aumentaram substancialmente em pacientes com sobrepeso e obesidade e que o tecido adiposo visceral era o principal responsável por esse aumento por possuir maiores quantidades de IL-1 β e IL-1Ra quando comparado ao tecido adiposo subcutâneo (77).

2.5 Fatores que influenciam no sobrepeso e na obesidade

2.5.1 Fatores gastrointestinais

O sistema nervoso central é responsável por coordenar e integrar sinais relacionados ao controle da homeostase energética oriundo de diferentes órgãos periféricos. Os primeiros sinais advêm do trato gastrointestinal por serem os primeiros órgãos a entrar em contato com os nutrientes provenientes da ingestão de alimentos (78). Existe comunicação entre o sistema gastrointestinal e o sistema nervoso central denominada eixo intestino-cérebro. Essa comunicação ocorre de maneira bidirecional, em que o cérebro se comunica com o intestino por meio de sinalização vagal eferente e por vias neuroendócrinas, e por sua vez, o intestino comunica-se com o cérebro por substâncias liberadas na circulação sanguínea bem como por nervos vagais e nervos aferentes da coluna vertebral (79). Ao serem ativados pela presença de conteúdo dentro do trato gastrointestinal, receptores presentes nas células enteroendócrinas do intestino são capazes de detectar a presença de hormônios com características orexígenas e anorexígenas que, por sua vez, são enviados ao cérebro por meio do eixo intestino-cérebro, participando da regulação da fome e saciedade a curto prazo (80). São produzidos pelo intestino e atuam na regulação da ingestão alimentar a grelina, único hormônio intestinal com ação orexígena, polipeptídeo pancreático (PP) e o peptídeo YY (PYY), colecistoquinina (CKK). Além disto são produzidos os peptídeos glucagon, oxintomodulina, peptídeo tipo glucagon – 1 e peptídeo tipo glucagon-2.

2.5.2 Fatores genéticos e epigenéticos

A etiologia da obesidade relacionada a mutações genéticas classifica-se de duas maneiras: obesidade mendeliana ou monogênica, que caracteriza indivíduos com uma única mutação genética rara influenciando drasticamente em sua adiposidade, e obesidade poligênica, representada pela variação do DNA em

diversos genes de forma combinada, em que cada gene exerce um efeito pequeno sobre a obesidade (81). São exemplos de síndromes que têm a obesidade como uma das características: síndrome de Prader-Willi, síndrome de Bardet-Biedl, síndrome de Alstrom, entre outras. Em crianças, a alteração genética responsável pela obesidade infantil mais comumente conhecida é o defeito do receptor de melanocortina-4 (82).

A epigenética define-se como fenômenos hereditários reversíveis que alteram a expressão gênica sem alteração da sequência do DNA (83). Em relação à obesidade, fatores epigenéticos relacionados ao desenvolvimento intrauterino, à regulação do apetite e ao aumento da adiposidade são encontrados na literatura. O baixo ou alto peso ao nascer, variações na disponibilidade de nutrientes durante a gestação, epimutações em genes específicos relacionados ao controle do apetite, entre outros, são alguns exemplos de aspectos epigenéticos associados ao surgimento da obesidade (84).

3 REVISÃO DE LITERATURA – CAPÍTULO II

3.1 Obesidade infantil

Considerada uma pandemia, a obesidade infantil é um desafio abrangente para a saúde no século 21 (85) (86). É um distúrbio que apresenta grandes implicações para a saúde mental e física do indivíduo, levando ao aumento da morbidade e mortalidade. A obesidade, tanto em adultos como no início da vida, deve ser entendida como uma doença crônica regulada por um complexo sistema neuroendócrino que visa à preservação da gordura. Recomenda-se tratamento multidisciplinar de cuidados crônicos baseado em diretrizes atuais, meta-análises, revisões sistemáticas e padrões de melhores práticas em todos os setores da saúde para aliviar e combater a obesidade infantil (85).

A predisposição genética à obesidade apresenta um paradoxo, no qual se questiona como as variantes genéticas com impacto negativo na saúde humana persistem no tempo evolutivo. No entanto, interações ambientais e genéticas, bem como as condições de indivíduos de comunidades desfavorecidas, parecem influenciar para que este grupo esteja mais propenso a desenvolver obesidade do que indivíduos mais ricos, em parte devido ao *imprinting* fetal e pós-natal (87).

Nos últimos 50 anos, inúmeras hipóteses surgiram para explicar a propensão humana à obesidade (88). Uma das hipóteses é a do genótipo econômico de Neel; esta consiste que o tecido adiposo extra permitiu que nossos ancestrais sobrevivessem a face dos ciclos de festa e fome (89). A hipótese, no entanto, é bastante simplista pois se estes fatores fossem realmente vantajosos para os indivíduos, eles deveriam ter sido incorporados ao seu genoma e a obesidade seria a norma em populações modernas (90). Isso, no entanto, não é o caso, pois já se verificou que existem variantes genéticas conferindo proteção contra a obesidade em humanos (91,92). Há também a hipótese do fenótipo econômico, que propõe que a nutrição inadequada no início da vida altere a estrutura e função dos órgãos e

tecidos, e que, em situação de abundância de alimentos, o indivíduo se torne obeso e, portanto, com risco de doença cardiovascular e hiperglicemia (93).

Existe ainda a hipótese do epigenótipo econômico, que propõe que todos os humanos possuem um genótipo econômico e que os estímulos ambientais levam à variabilidade fenotípica dentro de uma gama de fenótipos aceitáveis por meio de modificações epigenéticas (94). Essas modificações epigenéticas podem então ser transmitidas as demais gerações estabelecendo uma maior propensão da população humana à obesidade.

Fatores genéticos e epigenéticos podem ter contribuído para que a prevalência de obesidade infantil tenha aumentado em todo o mundo (95). Além destes fatores, aqueles ambientais derivados dos hábitos de vida tem papel importante na prevalência da obesidade infantil.

A partir dos anos 80, tornou-se evidente o excesso de peso e a obesidade em crianças (5). Outro dado alarmante expôs que, no ano de 2010, 43 milhões de crianças abaixo de cinco anos de idade estavam acima do peso ou obesas, sendo que aproximadamente 35 milhões dessas crianças eram de países de baixa e de média renda (96). As taxas de obesidade infantil continuam a aumentar em alguns países, como por exemplo, México, Índia, China e Canadá, embora haja evidências de uma desaceleração desse aumento ou mesmo de um platô em algumas faixas etárias (85). Ainda, a Comissão da Organização Mundial de Saúde sobre o fim Obesidade Infantil (85) revelou que a obesidade infantil, incluindo crianças em idade pré-escolar e adolescentes, possui proporções ameaçadoras em muitos países, representando um desafio urgente e sério.

No Brasil, a situação não é menos grave. Um estudo recente aponta que crianças acima do peso possuem 75% mais chance de serem adolescentes obesos e 89% de chance de serem adultos obesos. Pesquisas de 2019 do Ministério da Saúde indicam que 12,9% das crianças brasileiras de 5 a 9 anos são obesas e 18,9% dos adultos estão acima do peso. Uma ação sugerida pelo Ministério da Saúde no combate à obesidade infantil é o incentivo do aleitamento materno, além de políticas de estímulo ao hábito saudável, como ações de alimentação e atividade física (97).

As causas da obesidade infantil se devem a diversos fatores. Dentre eles, mudanças estruturais nos hábitos alimentares de crianças e adolescentes nas últimas décadas levando a maior ingestão de gorduras e açúcares e menor consumo

de alimentos ricos em fibras. Estas mudanças no hábito alimentar ocorreram em nível global, explicando o aumento da prevalência de obesidade tanto nos países desenvolvidos, quanto nos países em desenvolvimento (98,99). Neste sentido, o processo de industrialização dos alimentos é tido como um dos principais responsáveis pelo crescimento energético da dieta da maioria das populações do Ocidente (100).

Além da mudança no hábito alimentar, o *habitus vitae*, ou seja, o estilo de vida diminuiu o espaço para a prática de atividade física, o qual, associado ao aumento tecnológico e a popularização de jogos e aparelhos eletrônicos, contribuiu para o aumento do sedentarismo (101). Este conjunto de fatores podem então ocasionar a obesidade e doenças associadas, não só em adultos, mas também em crianças (102–104).

Uma vez estabelecida a obesidade infantil, é difícil reverter esta tendência na vida adulta (105,106), sendo, então, importante a prevenção primária. Como mencionado, a obesidade adulta está associada ao aumento do risco de doença cardíaca, acidente vascular cerebral, síndrome, diabetes tipo 2 e alguns tipos de câncer (107). Crianças obesas têm pior desempenho psicológico e de bem-estar e níveis elevados de riscos cárdio-metabólicos (108). Apresentam também comorbidades ligadas à obesidade, tais como pressão arterial alta, altos níveis de colesterol e tolerância à insulina. Acrescente-se ainda que a obesidade infantil pode causar problemas musculoesqueléticos, apneia obstrutiva do sono, asma e uma série de problemas psicológicos (109). A obesidade infantil também está associada à diabetes tipo 2 e a doenças cardíacas na idade adulta e com a mortalidade de meia-idade (110).

A inflamação crônica na obesidade ou sobrepeso, além de desempenhar papel importante na patogênese de várias doenças cardiovasculares e metabólicas, afeta também a função cerebral e o comportamento (111). Neste sentido, em relação à depressão e à ansiedade, existem relatos de que crianças obesas ou com sobrepeso apresentam cerca de 3,1 vezes mais sintomas depressivos e ansiosos que crianças com peso normal (112), levando a menor qualidade de vida e interações psicossociais (113). No entanto, estes dados são conflitantes pois alguns estudos relataram taxas relativamente baixas destes sintomas, que variam entre 7% e 16% (114,115), enquanto outros mostraram taxas mais elevadas, entre 47% e 53% (116,117).

Portanto, a obesidade infantil apresenta-se como um problema de saúde pública com consequências amplas na saúde física e mental dos indivíduos na infância que podem se refletir em períodos mais tardios de sua vida.

3.2 Modelos de obesidade infantil

Segundo Lutz e Woods (118), alguns critérios para escolher modelos animais para o estudo da obesidade são: ter sido utilizado com frequência em pesquisas sobre obesidade, ter uma perspectiva histórica, permitindo por exemplo a identificação das principais áreas do cérebro envolvidas no controle da alimentação e do peso corporal, o modelo animal deve mostrar um fenótipo distinto de obesidade, hiperfagia ou alteração no metabolismo energético e também deve apresentar algumas das comorbidades mais frequentes da obesidade, como hiperglicemia, resistência à insulina ou síndromes semelhantes ao diabetes.

Nos estudos sobre a obesidade infantil em animais, diferente do que ocorre em animais adultos, a indução de obesidade é mais restrita, uma vez que os procedimentos empregados em animais adultos, como alterações na dieta alimentar, não são aplicáveis. Sendo assim, os modelos de obesidade infantil são restritamente genéticos (119), de origem materna por alteração na dieta durante a gestação (120,121) e lactação (122,123), e aqueles com redução da prole das ninhadas (29,31,33,124), sendo este último o mais citado na literatura (29,32,33,124,125) .

Os trabalhos realizados com este modelo mostraram que a obesidade infantil aumenta o risco para a ocorrência de diabetes e prejuízos cardiovasculares (33), aumenta a insulina hipotalâmica perinatal e induz a malformação de neurônios galaninérgicos hipotalâmicos (28), reduz a inibição da leptina no núcleo arqueado do hipotálamo, o que indica que em animais obesos pode ocorrer resistência à leptina, levando à hiperfagia persistente e ao excesso de peso. Além disso, a obesidade infantil altera neuropetídeos orexígenos e anorexígenos em neurônios da área periventricular do hipotálamo (29). Davidowa et al. e Velkoska também mostraram que a obesidade infantil promove efeitos a longo prazo na pressão arterial, redução no NPY no hipotálamo e em marcadores da obesidade (concentrações plasmáticas de leptina, adiponectina e insulina) (30,126), induz resistência à insulina no núcleo arqueado do hipotálamo (125), aumenta a atividade de glicocorticoides e modifica a ontogenia da microbiota intestinal (127).

Vários estudos utilizaram o modelo de redução da ninhada para investigar os efeitos da nutrição a longo prazo, porém são poucas as informações sobre os efeitos desta redução em parâmetros de desenvolvimento e neurocomportamentais na interação mãe-filhote, bem como em períodos mais tardios da vida do animal, até a maturidade.

Carvalho et al. (124) verificaram que a redução da ninhada em 2 machos e 1 fêmea diminuiu o comportamento social em ambos sexos na idade pré-púbere. Com relação ao comportamento maternal, observou-se que o comportamento de amamentação e de lambar foi maior nas ninhadas com redução de filhotes. Os autores evidenciam que a redução da ninhada pode ter afetado o comportamento lúdico, prejudicando assim o desenvolvimento cognitivo e social destes animais.

Mais recentemente, este mesmo grupo de pesquisa investigou os efeitos da redução da ninhada (com 3 animais) sobre cuidados maternos, comportamentos tipo-ansioso e medo em ratos durante a idade adulta comparados a ninhadas com 12 animais (32). Observou-se que a redução da ninhada aumentou a posição arqueada da mãe (*crouching*) e o lambar da prole. Os filhotes da redução da ninhada apresentaram hiperfagia, aumento do ganho de peso, aumento da massa adiposa visceral, dislipidemia e hiperleptinemia na idade adulta. A prole com redução da ninhada, de ambos os sexos, apresentou um fenótipo ansioso no labirinto em cruz elevado e menor tempo gasto no congelamento durante o teste de condicionamento ao medo, comparado às ninhadas com 12 animais. Os autores apontam que estas mudanças comportamentais da prole podem ter ocorrido, pelo menos em parte, em decorrência do aumento do cuidado materno com a prole. Vale ressaltar que esses achados são de grande importância e apontam implicações para a pesquisa no desenvolvimento e na neuropsiquiátrica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Estudar os efeitos da hipernutrição neonatal no ganho de peso, no desenvolvimento e no comportamento, bem como em parâmetros bioquímicos em ratos machos observados na idade pré-púbere.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Antes de qualquer procedimento, o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista (UNIP) (permit 005/18).

Inicialmente, foram empregados 20 ratas e 10 ratos, da linhagem Wistar, com aproximadamente 90 dias de vida e pesando 220-275g, provenientes do Biotério Central do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil. Os animais foram trazidos ao Biotério de Experimentação da Universidade Paulista e alojados (em grupos de 3 a 4 animais do mesmo sexo) em gaiolas-moradias (45,5 x 34,5 x 20 cm) forradas com aparas de madeira esterilizadas e isentas de resíduos. As gaiolas permaneceram em sistema de *rack* ventilado sob condições controladas de temperatura (22-26°C), umidade (50-65%) e ciclo de luz controlado (luzes acesas às 07:00 h). Os ratos tiveram livre acesso à água filtrada e ração irradiada (BioBase, Águas Frias, SC, Brasil).

5.2 Diagnóstico da prenhez

Após dez dias de habituação, os animais foram transferidos para a sala de ciclo invertido claro-escuro (luzes acesas automaticamente às 19h e apagadas às 7h), sendo mantidos em cada gaiola duas fêmeas e um macho com o objetivo do acasalamento. Para a verificação da prenhez, o lavado vaginal foi realizado conforme descrito por Udo et al. (128) no período da manhã (8h às 10h).

Ao ser determinada a prenhez, foi considerado aquele o dia de gestação 0 (DG 0) e então as fêmeas foram alocadas individualmente em gaiolas moradias até o nascimento da prole. Todas as fêmeas puderam parir e amamentar normalmente os filhotes.

5.3 Formação dos grupos

Para a formação dos grupos, foram escolhidas aleatoriamente 10 progenitoras para constituir o grupo controle (GC) e 10 progenitoras para compor o grupo experimental denominado hipernutrição (GH). O dia do nascimento foi considerado como DPN 1 e neste dia não foi realizada nenhuma manipulação nas progenitoras ou filhotes com o intuito de evitar que as progenitoras cometessem infanticídio ou canibalismo (129). No DPN 2 as progenitoras do grupo GC tiveram suas ninhadas padronizadas com 8 filhotes, sendo 4 machos e 4 fêmeas, e as progenitoras do grupo GH tiveram suas ninhadas reduzidas para 4 filhotes, sendo 3 machos e 1 fêmea. Esta padronização teve como objetivo manter o maior número de filhotes machos, que foram o foco deste estudo, mas com a presença de uma fêmea na ninhada, padronização esta que aumenta o cuidado materno e promove hiperfagia na prole (32).

Para a determinação do sexo do animal, foi realizada a mensuração da distância ano-genital com o auxílio de um paquímetro. Os filhotes tiveram as patas delicadamente marcadas com nanquim para a identificação. Dependendo do teste a ser realizado, foi utilizado de 1 a 3 animais de cada ninhada.

5.4 Estudos maternos

5.4.1 Comportamento maternal

O comportamento materno é essencial para a sobrevivência da prole (130); com o intuito de eliminar possíveis alterações no desenvolvimento dos filhotes bem como em suas respostas comportamentais, foi realizado a observação do cuidado materno, conforme descrito por Sandini (131). Para tanto, as progenitoras foram observadas, entre os dias 5 e 7 da lactação, período de exacerbação do comportamento materno, por 30 minutos, juntamente com seus filhotes. Antes da avaliação, a mãe foi isolada em uma gaiola em uma sala distante dos filhotes por 60 minutos. Os filhotes foram colocados em outra gaiola com maravalha limpa, sendo mantidos aquecidos por uma manta térmica até o início da observação do comportamento materno. A caixa moradia teve seu ninho desfeito. Após os 60 minutos de isolamento, os filhotes foram colocados de volta na caixa moradia e foram espalhados aleatoriamente do lado contrário em que estava inicialmente o ninho. A seguir a mãe foi introduzida na caixa moradia.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- **Tempo de recolhimento dos filhotes** (em segundos);
- **Frequência, tempo total e tempo máximo de autolimpeza materno** (em segundos);
- **Frequência, tempo total e máximo de limpeza nos filhotes** (em segundos);
- **Tempo total e tempo máximo de amamentação em que a mãe permaneceu sobre os filhotes** (em segundos).

Define-se limpeza dos filhotes como o ato da mãe lambe o filhote.

5.4.2 Atividade geral em campo aberto

O teste de campo aberto foi originalmente descrito por Hall (132), e utilizado posteriormente como ferramenta de avaliação da atividade locomotora e exploratória bem como do comportamento tipo-ansioso de roedores (133). Desta forma, no DPN 21, as progenitoras realizaram o teste de campo aberto com o intuito de avaliar possíveis níveis de ansiedade. O aparelho utilizado consiste em uma arena de madeira redonda pintada de branco com 96cm de diâmetro dividida em 25 partes conforme modelo utilizado por Joaquim (134). As progenitoras foram colocadas individualmente no centro do campo aberto e filmadas por uma câmera de vídeo montada sobre um tripé adjacente ao aparato, para posterior análise, durante cinco minutos sempre no mesmo período do dia (de 9h às 12h). Entre a troca de animal e

outro, o aparelho foi limpo com álcool 5% para eliminar qualquer odor provindo do animal anterior. Foram avaliados os seguintes parâmetros nas progenitoras:

- **Frequência de autolimpeza:** número de vezes que o animal esfregou as patas dianteiras no focinho em movimentos circulares;
- **Tempo total e máximo de autolimpeza** (em segundos);
- **Frequência de levantar-se:** número de vezes em que o animal ficou apoiado somente sobre as patas traseiras, firmando-se ou não nas paredes do campo aberto;
- **Tempo total e máximo de exploração vertical** (em segundos);
- **Frequência de imobilidade:** número de vezes em que a fêmea não se movimentou;
- **Tempo total e máximo de imobilidade** (em segundos);
- **Tempo total do animal na periferia do aparelho:** tempo em que a fêmea explorou a periferia do campo aberto (em segundos);
- **Tempo total do animal no centro do aparelho:** tempo em que a fêmea explorou o centro do campo aberto (em segundos).

5.5 Estudos com a prole

5.5.1 Avaliação do ganho de massa corporal e índice de Lee

Para a avaliação do desenvolvimento ponderal dos filhotes e cálculo do índice de Lee, os animais foram pesados e anotou-se o comprimento do focinho até o início da cauda nos DPNs 2, 9, 21 e 31. O índice de Lee é uma medida antropométrica utilizada para determinar obesidade em roedores e se dá pela divisão da raiz cúbica do peso pelo comprimento-anal (135) (136). Calculou-se também o índice de massa corporal que consiste em dividir o peso corporal (em gramas) pelo comprimento nasoanal em cm^2 (136).

5.5.2 Avaliação do desenvolvimento físico, reflexológico e motor

Os parâmetros do desenvolvimento físico, reflexológico e motor da prole foi realizado conforme descrito por Udo (128) entre os DPNs 2 à 30.

A avaliação do desenvolvimento físico permite verificar se os procedimentos realizados alteraram o desenvolvimento físico dos animais uma vez que estes dependem de fatores de crescimento, em particular do fator de crescimento epidérmico (137). Para a avaliação do desenvolvimento físico dos animais foram observados os dias de ocorrência dos seguintes parâmetros: desdobraimento das orelhas, abertura dos olhos, erupção dos dentes incisivos, nascimento de pelos e descida dos testículos. Estas observações foram realizadas diretamente em cada filhote.

- **Desdobraimento de orelha:** os filhotes escolhidos de cada ninhada foram observados entre o 1º e o 5º dia de lactação, quanto à ocorrência ou não deste parâmetro;

- **Erupção dos dentes incisivos:** observada pela abertura da boca dos filhotes escolhidos, entre o 6º e o 12º dia de lactação, sendo registrado o dia exato do aparecimento do esmalte dos dentes superiores e inferiores;

- **Abertura dos olhos:** registrado o dia da ocorrência da primeira fresta da abertura dos dois olhos. Esta observação foi realizada entre o 10º ao 15º dia da lactação;

- **Aparecimento de pelos:** o período provável de aparecimento de pelos compreende do 5º aos 8º dias de vida. Diferem-se da penugem pelo comprimento, que aparece logo no 1º ou 2º dia após o nascimento do filhote;

- **Descida dos testículos:** observa-se a ocorrência deste parâmetro entre o 18º e 30º dia de vida dos filhotes.

5.5.3 Avaliação do desenvolvimento reflexológico e motor

A avaliação do desenvolvimento reflexológico e motor permite a identificação de possíveis alterações comportamentais desde o início de vida do animal. Tal avaliação consistiu na mensuração dos seguintes parâmetros:

- **Reflexo de preensão palmar:** o animal é contido em uma das mãos do(a) pesquisador(a), e uma das patas do filhote é tocada com a ponta de um clipe para avaliação da ocorrência do reflexo. O critério para ocorrência é que o animal feche a pata ao contato físico com o clipe. Este teste é realizado no 2º, 4º, 6º, 8º e 10º dia da lactação, sendo que este é o único teste em que o reflexo desaparece ao longo do

tempo. Anotou-se o dia em que o comportamento ocorreu;

- **Reflexo de endireitamento de postura:** o animal é colocado em decúbito dorsal, sendo medida a ocorrência ou não da resposta de virar o corpo para a posição de decúbito ventral. O critério para o registro desse reflexo é que, ao virar-se, o animal fique com as quatro patas espalmadas na superfície. O período de latência máximo para este teste é de 30 segundos. Este reflexo é observado do 5° ao 10° dia de lactação. Anotou-se o dia em que o comportamento ocorreu;

- **Reflexo de geotaxia negativa:** o animal é colocado em uma rampa de aproximadamente 45° de inclinação, a 5 cm do final inferior dessa superfície, com a cabeça direcionada para baixo. Anota-se a latência (não superior a 30 segundos), para os animais se voltarem a posição oposta, ou seja, voltados com a cabeça para cima. Quando os animais não apresentam o reflexo na 1° tentativa, eles serão testados mais 2 vezes com a mesma latência. A ocorrência na 1°, 2° ou 3° tentativa também foi registrada. Este reflexo é observado no 5°, 7°, 9°, 11° e 13° dia de lactação. A latência máxima foi de 1 minuto. Anotou-se o dia em que o comportamento ocorreu;

- **Dia de andar adulto:** os animais foram colocados em uma superfície plana e observou-se se estes apoiavam sobre as quatro patas sem encostar o ventre na superfície plana. Quando isto é observado anota-se, então, o dia de andar adulto. Este parâmetro é observado do 10° ao 18° dia de lactação ou até o dia em que os animais executam a ação.

5.5.4 Atividade geral em campo aberto

No DPNs 21 e 31 os filhotes realizaram o teste de campo aberto para avaliação da atividade locomotora e exploratória. É importante salientar que foram utilizados animais diferentes nos dois períodos de avaliação para evitar a influência da exposição previa ao campo aberto. Foi utilizado o aparato descrito por Reis-Silva et al. (138), que consiste em uma arena de madeira, adaptada para filhotes de ratos. O fundo deste aparelho é dividido em vinte e cinco partes aproximadamente iguais. Os filhotes realizaram o teste sob as mesmas condições descritas no item 5.4.2. Foram analisados os seguintes parâmetros:

- **Frequência de locomoção:** ato de o animal penetrar com as quatro patas em uma das unidades de divisões do chão da arena;

- **Frequência de levantar-se:** postura de o animal ao permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima, podendo ou não tocar as patas dianteiras nas paredes do campo aberto;
- **Duração de imobilidade:** quando o animal não realiza nenhum movimento (em segundos).

Figura 2 – Arena de campo aberto utilizada para avaliar a atividade locomotora e exploratória dos filhotes nos DPNs 21 e 31



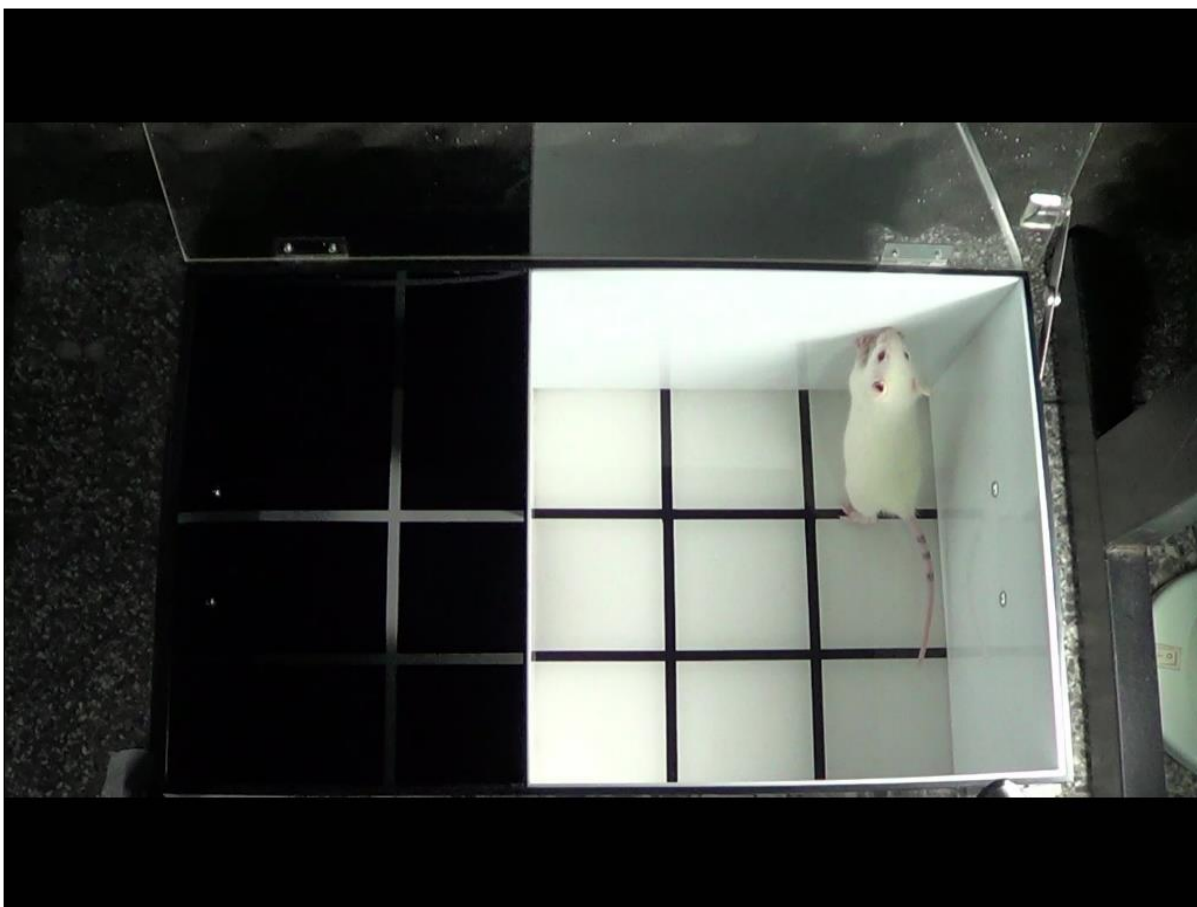
Fonte: Sampaio, 2018.

5.5.5 Teste de transição claro-escuro

O teste de transição claro-escuro foi utilizado para avaliação do comportamento tipo-ansioso dos animais (139). Este teste foi realizado em uma arena de acrílico (A x L x C: 205 x 275 x 455mm) com dois compartimentos: um escuro pequeno (A x L x C: 200 x 265 x 175mm) e um claro grande (A x L x C: 200 x 265 x 260mm). Esses compartimentos são divididos por uma porta pela qual os roedores podem atravessar. A arena clara funciona nesse teste como um estímulo ansiogênico. Dessa forma, espera-se um conflito entre a motivação de explorar um ambiente novo e evitar o compartimento claro, tido como aversivo e iluminado por uma fonte de luz (lâmpada de 60 watts). Brevemente, os animais foram colocados individualmente no compartimento claro, com a cabeça voltada em direção à parede, permitindo que explorassem o aparato, e filmados por uma câmera de vídeo montada sobre um tripé adjacente ao aparato durante 5 minutos para posterior análise. Para evitar interferências olfatórias de animais analisados previamente, o aparato foi higienizado com solução de álcool a 5%. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- **Latência para o animal entrar no compartimento escuro** (em segundos);
- **Tempo** (em ambos compartimentos em segundos);
- **Número de passagens.**

Figura 3 – Arena de acrílico com compartimentos claro e escuro utilizada para avaliar o comportamento tipo-ansioso dos filhotes no DPN 31



Fonte: Sampaio, 2018

5.5.6 Teste de natação forçada

Proposto por Porsolt et al. (140) em camundongos, este teste também foi desenvolvido para avaliação do comportamento tipo-depressivo em ratos (141). Para a realização do teste, foi utilizado um cilindro de acrílico (50cm de altura e 22cm de diâmetro), com água na profundidade de 30cm e temperatura média de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais foram filmados individualmente durante 6 minutos por uma câmera de vídeo posicionada em frente ao cilindro para posterior análise. Ao término de cada avaliação, os ratos foram retirados do cilindro, secos com toalha e a água foi trocada. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- **Tempo de latência para primeira flutuação:** tempo em que cada animal permanece em completa imobilidade antes de começar a se movimentar (em segundos);
- **Tempo de imobilidade:** tempo em que, após a latência, cada animal deixa de se movimentar dentro do cilindro (em segundos),
- **Tempo de escalada:** tempo de movimentos vigorosos em tentativa de fuga,

com as patas dianteiras acima da superfície da água ou contra a parede do cilindro (em segundos).

Figura 4 – Cilindro de acrílico utilizado para o teste de natação forçada para avaliar o comportamento tipo-depressivo dos filhotes no DPN 31



Fonte: Sampaio, 2018

5.5.7 Peso das gorduras

Foram coletadas e pesadas no DPN 31 as gorduras omental, retroperitoneal e epidídimal dos filhotes.

5.6 Avaliações bioquímicas

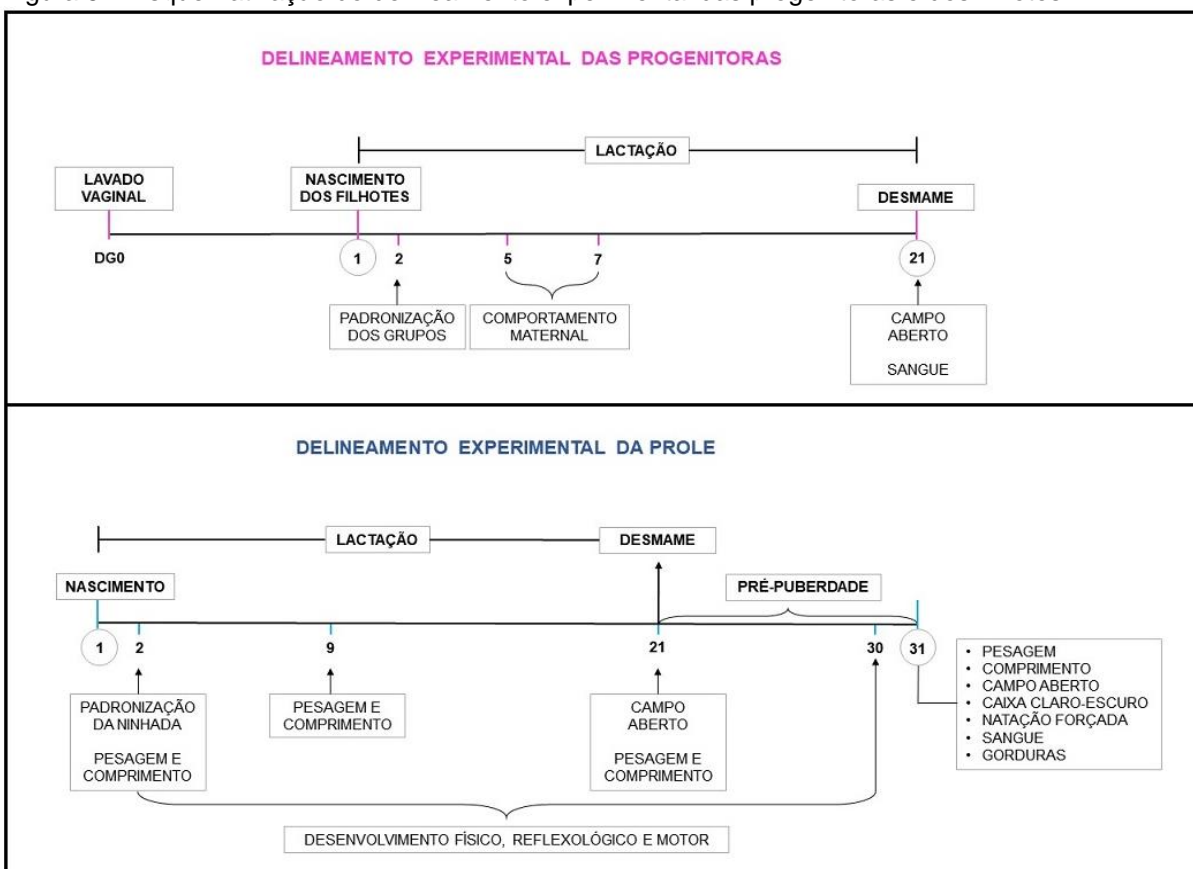
As progenitoras, ao desmame, e os filhotes, após o término das observações comportamentais no DPN 31, foram submetidos à eutanásia por decapitação. O sangue foi coletado e centrifugado (3.500 RPMs por 15 minutos) para obtenção do soro. As amostras foram congeladas a -80°C para posterior análise. Foram avaliados os níveis séricos das citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α , bem como os níveis de corticosterona e ACTH. As análises foram realizadas por LUMINEX, seguindo as

instruções do fabricante (Milliplex[®], cat. no. RECYTMAG-65K, USA). Também foram retiradas e pesadas as gorduras omental, retroperitoneal e gonadal.

5.7 Delineamento experimental

Para o acasalamento e obtenção das proles, as fêmeas foram introduzidas na caixa de um macho sexualmente experiente na proporção de duas fêmeas para cada macho. Para a determinação da prenhez, foi realizado o lavado vaginal das fêmeas no período da manhã (8h). Ao ser detectada a presença de espermatozoides no lavado vaginal, foi considerado aquele o dia de gestação zero (DG 0), e cada fêmea foi alojada individualmente em gaiolas moradia, sendo divididas aleatoriamente em grupos controle (n = 10) e experimental (n = 10). O dia de nascimento foi registrado como dia pós-natal (DPN) 1 e nenhum manuseio foi realizado neste dia para evitar que houvesse rejeição dos filhotes pela mãe. No DPN 2, as progenitoras do grupo experimental tiveram suas ninhadas reduzidas para 4 filhotes, permanecendo 3 machos e 1 fêmea (Grupo Hipernutrição – GH), enquanto as progenitoras do grupo controle tiveram suas ninhadas padronizadas com 8 filhotes, permanecendo 4 machos e 4 fêmeas (Grupo Controle – GC), sendo a ninhada contabilizada como unidade para o estudo. Nos DPNs 2, 9, 21 e 31 os animais foram pesados e foram anotados seus comprimentos. Do DPN 2 ao 30, os filhotes foram observados quanto ao desenvolvimento físico, reflexológico e motor. No DPN 21, foi realizado o desmame e os filhotes machos foram alojados de acordo com o seu grupo nutricional, seguindo as condições de alojamento descritas no item 3.1. A prole feminina foi separada para uso em outros estudos. No mesmo dia do desmame, foi observada a atividade geral das progenitoras e dos filhotes machos no campo aberto e foi coletado o sangue das progenitoras para avaliação dos níveis séricos de citocinas, corticosterona e ACTH. No DPN 31, os filhotes foram observados na atividade geral em campo aberto, no teste de transição claro-escuro e no teste de natação forçada. Após os procedimentos comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação, o sangue foi coletado para análises bioquímicas e as gorduras omental, retroperitoneal e epididimal foram coletadas e pesadas. Foram utilizados 1-3 animais de cada ninhada dependendo do parâmetro observado e/ou teste realizado. Todos os experimentos foram realizados entre 8 e 12h, visando minimizar os efeitos dos ritmos circadianos.

Figura 5 – Esquematização do delineamento experimental das progenitoras e dos filhotes



Fonte: Elaborado pela autora.

5.8 Análise estatística

A homogeneidade e normalidade foram verificadas pelos testes de Bartlett e F. Nos dados de uma variável, foram utilizados o teste *t* de Student, quando os dados eram paramétricos, e o teste U de Mann-Whitney para dados não paramétricos. A ANOVA de duas vias foi utilizada para análise de dados com 2 variáveis. Esses procedimentos foram testados para possíveis *outliers* pelo método de ROUT. O teste de correlação de Pearson foi empregado para comparações de dados. As análises foram realizadas por meio do programa de análise estatística GraphPad Prism 7. A probabilidade de 5% foi considerada como capaz de evidenciar diferenças significantes entre os grupos.

Nota: Os resultados serão apresentados sob forma de publicação de artigo para evitar autoplagio.

REFERÊNCIAS

1. Karnik S, Kanekar A. Childhood obesity: A global public health crisis. *Int J Prev Med*. 2012;3(1):1–7.
2. Arroyo-Johnson C, Mincey KD. Obesity Epidemiology Worldwide. *Gastroenterol Clin North Am*. Elsevier Inc. 2016;45(4):571–9.
3. World Health Organization. Obesity and overweight [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 16 feb 2018 [citado 24 abr 2018]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
4. Arroyo K, Herron DM. The epidemiology of obesity. In: Thompson CC. *Bariatric Endoscopy*. New York: Springer; 2013. p 1–9.
5. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766–81.
6. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*. 2015;33(7):673–89.
7. Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW, et al. Obesity and type 2 diabetes: What Can be unified and what needs to be individualized? *Diabetes Care*. 2011;34(6):1424–30.
8. Patschan S, Scholze J. Obesity-related hypertension. *Cardiology Review*. 2007;24(12):32–35.
9. Lavie CJ, Milani R V., Ventura HO. Obesity and Cardiovascular Disease. Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53(21):1925–32.
10. Zammit C, Liddicoat H, Moonsie I, Makker H. Obesity and respiratory diseases. *Int J Gen Med*. 2010;3:335–43.
11. Arnold M, Leitzmann M, Freisling H, Bray F, Romieu I, Renehan A, et al. Obesity and cancer: An update of the global impact. *Cancer Epidemiol [Internet]*. 2016;41:8–15. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2016.01.003>.
12. Kokkoris P, Pi-Sunyer FX. Obesity and endocrine disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003;32(4):895–914.
13. Berkowitz RI, Fabricatore AN. Obesity, psychiatric status, and psychiatric medications. *Psychiatr Clin North Am [Internet]*. 2005;28(1):39–54. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psc.2011.08.007>.
14. Kanneganti TD, Dixit VD. Immunological complications of obesity. *Nat Immunol [Internet]*. 2012;13(8):707–12. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2343>.

15. Abdelaal M, le Roux CW, Docherty NG. Morbidity and mortality associated with obesity. *Ann Transl Med* [Internet]. 2017;5(7):161–161. Disponível em: <http://atm.amegroups.com/article/view/14394/14547>.
16. Han JM, Levings MK. Immune Regulation in Obesity-Associated Adipose Inflammation. *J Immunol*. 2013 Jul;191(2):527–32.
17. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2006;83(2):461–5. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16470013>.
18. Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications. *Arch Med Sci*. 2017;13(4):851–63.
19. Catelli De Carvalho MH. I diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2005;84(Suppl 1).
20. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice*. 2014;2014:943162.
21. Ferrante AW. Obesity-induced inflammation: A metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med*. 2007;262(4):408–14.
22. Sahoo K, Sahoo B, Choudhury AK, Sofi NY, Kumar R, Bhadoria AS. Childhood obesity: causes and consequences. *J Fam Med Prim care*. 2015;4(2):187–92.
23. Abarca-Gómez L, Abdeen ZA, Hamid ZA, Abu-Rmeileh NM, Acosta-Cazares B, Acuin C, et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 2017;390(10113):2627–2642.
24. Must A, Strauss RS. Risks and consequences of childhood and adolescent obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999;23(Suppl 2):S2–11.
25. Koyuncuoğlu Güngör N. Overweight and Obesity in Children and Adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* [Internet]. 2014;6(3):129–43. Disponível em: <http://cms.galenos.com.tr/FileIssue/1/607/article/129-143.pdf>.
26. Kiess W, Galler A, Reich A, Müller G, Kapellen T, Deutscher J, et al. Clinical aspects of obesity in childhood and adolescence. *Obes Rev*. 2001;2(1):29–36.
27. Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009;60(Suppl 3):17–35.
28. Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W, et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of

- neonatally overfed rats. *Brain Res.* 1999;836(1–2):146–55.
29. Davidowa H, Plagemann A. Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. *Neuroreport.* agosto de 2000;11(12):2795–8.
 30. Davidowa H, Li Y, Plagemann A. Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (α -MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. *Eur J Neurosci.* 2003;18(3):613–21.
 31. Spencer SJ, Tilbrook A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34(8):1133–43.
 32. Enes-Marques S, Giusti-Paiva A. Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. *J Physiol Sci.* 2018 Nov;68(6):789–98.
 33. Plagemann A, Heidrich I, Götz F, Rohde W, Dörner G. Obesity and Enhanced Diabetes and Cardiovascular Risk in Adult Rats due to Early Postnatal Overfeeding. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1992;99(3):54–158.
 34. Andel M, Polák J, Kraml P, Dlouhý P S V. Chronic mild inflammation links obesity, metabolic syndrome, atherosclerosis and diabetes. *Vnitr Lek.* 2009;55(7–8):659–65.
 35. E S, Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology.* 2007;132:2169–80.
 36. Aballay LR, Eynard AR, Díaz M del P, Navarro A, Muñoz SE. Overweight and obesity: A review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. Vol. 71, *Nutrition Reviews.* 2013. p. 168–79.
 37. Hsueh W, Deng T. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2016;11:421–449.
 38. Kuriyan R. Body composition techniques. *Indian Journal of Medical Research.* 2018;148(5):648–658.
 39. Aggarwal B, Jain V. Obesity in Children: Definition, Etiology and Approach. *Indian Journal of Pediatrics.* 2017;85(6):1–9.
 40. Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes Facts.* 2017;10(3):207–205.
 41. Rothman KJ. BMI-related errors in the measurement of obesity. *Int J Obes.* 2008; 32:S56–S59.
 42. Gonzalez MC, Correia MITD, Heymsfield SB. A requiem for BMI in the clinical

- setting. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2017; 20(5):314–321.
43. World Health Organization. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health [Internet]. 2019 [citado 17 de outubro de 2019]. Available at: https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood_what/en/
 44. World Health Organization. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health [Internet]. 2019 [citado 05 mar 2019]. Disponível em: https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood_what/en/.
 45. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2017: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde; 2019 [revisada em 2019; citado em: 23 nov 2019]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2017_vigilancia_fatores_risco_1ed_rev.pdf.
 46. Alvarez-Leite JI, Soares FLP, Teixeira LG. Controle Neuroendócrino da Saciedade. In: *Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica*. Editora Edgard Blücher; 2016. p. 389–410.
 47. Damiani D, Damiani D. Sinalização cerebral do apetite *. *Rev Bras Clin Med São Paulo*. 2011;9(2):138–45.
 48. Landeiro FM, Quarantini LDC. Obesidade: Controle Neural e Hormonal do Comportamento Alimentar. *Rev Ciências Médicas e Biológicas*. 2011;10(3)236–245.
 49. Timper K, Brüning JC. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: Pathways to obesity. *DMM Dis Model Mech*. 2017;10(6):679–689.
 50. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661–71.
 51. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661–71.
 53. Abdalla MMI. Central and peripheral control of food intake. *Endocr Regul*. 2017;51(1):52–70.
 52. Lee PC, Dixon JB. Food for Thought: Reward Mechanisms and Hedonic Overeating in Obesity. *Current obesity reports*. 2017;6(4):353–361.
 53. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006;443:289–95.
 54. Lo KA, Sun L. Turning WAT into BAT: A review on regulators controlling the

- browning of white adipocytes. *Bioscience Reports*. 2013;33(5):e00065.
55. Lynes MD, Tseng YH. Deciphering adipose tissue heterogeneity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2018;1411(1):5–20.
 56. Rui L. Brown and beige adipose tissues in health and disease. *Compr Physiol*. 2017;7(4):1281–1306.
 57. Wang Z, Yuan D, Duan Y, Li S, Hou S. Key factors involved in obesity development. *Eating and Weight Disorders*. 2018;23(3):267–274.
 58. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004;89(6):2548–56.
 59. Stolarczyk E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Current Opinion in Pharmacology*. 2017;37:35–40.
 60. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *Jornal de pediatria*. 2007;83(5 Supl):S192–203.
 61. Balsan GA, Da Costa Vieira JL, De Oliveira AM, Portal VL. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2015;61(1):72–80.
 62. Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, et al. New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *BioMed Research International*. 2014;2014:658913.
 63. Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clinica Chimica Acta*. 2007;380(1-2):24–30.
 64. Wasim M, Awan FR, Najam SS, Khan AR, Khan HN. Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity. *Biochemical Genetics*. 2016;54(5):565–72.
 65. Zhang F, Chen Y, Heiman M, DiMarchi R. Leptin: Structure, Function and Biology. *Vitamins and Hormones*. 2005;71:345–72.
 66. La Cava A. Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine*. 2017;98:51–58.
 67. Antuna-Puente B, Fève B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes and Metabolism*. 2008;34(1):2–11.
 68. Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. Insulin resistance associated to obesity: The link TNF- α . *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2008;114(3):183–94.
 69. J Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: A regulator of

- inflammation. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005;19(4):547–66.
70. Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 1997;8(4):253-65.
 71. Ballak DB, Stienstra R, Tack CJ, Dinarello CA, van Diepen JA. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine*. 2015;75(2):280-90.
 72. Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol*. 2016;17(8):906-913.
 73. Mayer-Barber KD, Yan B. Clash of the Cytokine Titans: Counter-regulation of interleukin-1 and type I interferon-mediated inflammatory responses. *Cellular and Molecular Immunology*. 2017;14(1):22-35.
 74. Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regen*. 2019;39:12.
 75. Yazdi AS, Ghoreschi K. The interleukin-1 family. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016;941:21-29.
 76. Engin A. The pathogenesis of obesity-associated adipose tissue inflammation. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017;.
 77. Lee MKS, Yvan-Charvet L, Masters SL, Murphy AJ. The modern interleukin-1 superfamily: Divergent roles in obesity. *Seminars in Immunology*. 2016;25(5):441-449.
 78. Bauer P V., Hamr SC, Duca FA. Regulation of energy balance by a gut-brain axis and involvement of the gut microbiota. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(4):737–55..
 79. Heiss CN, Olofsson LE. Gut Microbiota-Dependent Modulation of Energy Metabolism. *Journal of Innate Immunity*. 2018;10:163–171.
 80. Marić G, Gazibara T, Zaletel I, Labudović Borović M, Tomanović N, Cirić M, et al. The role of gut hormones in appetite regulation (review). *Acta Physiologica Hungarica*. 2014;101(4):395–407.
 81. Reddon H, Gueant J-L, Meyre D. The importance of gene-environment interactions in human obesity. *Clin Sci*. 2016;130(18):1571–97.
 82. Güngör NK. Overweight and obesity in children and adolescents. *JCRPE J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2014;6(3):129–43.
 83. Kaushik P, Anderson JT. Obesity: Epigenetic aspects. *Biomolecular Concepts*. 2016;7(3):145–155.

84. Drummond EM, Gibney ER. Epigenetic regulation in obesity. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2013;16(4):392–397.
85. WHO. Consideration of the evidence on childhood obesity for the Commission on Ending Childhood Obesity: report of the ad hoc working group on science and evidence for ending childhood obesity. Geneva, Switzerland, World Health Organization, Geneva, Switzerland; 2016.
86. Kumar S, Kelly AS. Review of Childhood Obesity. *Mayo Clin Proc*. 2017;92(2):251–65.
87. Qasim A, Turcotte M, de Souza RJ, Samaan MC, Champredon D, Dushoff J, et al. On the origin of obesity: identifying the biological, environmental and cultural drivers of genetic risk among human populations. *Obes Rev*. fevereiro de 2018;19(2):121–49.
88. Genné-Bacon EA. Thinking evolutionarily about obesity. *Yale J Biol Med*. 2014;87:99–1112.
89. Neel J V. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? 1962. *Bull World Health Organ*. 1999;77:8.
90. Speakman JR. Thrifty genes for obesity, an attractive but flawed idea, and an alternative perspective: the ‘drifty gene’ hypothesis. *Int J Obes*. 2008;32(11):1611–7.
91. Geller F, Reichwald K, Dempfle A, Illig T, Vollmert C, Herpertz S, et al. Melanocortin-4 Receptor Gene Variant I103 Is Negatively Associated with Obesity. *Am J Hum Genet*. 2004;74(3):572–81.
92. Stutzmann F, Vatin V, Cauchi S, Morandi A, Jouret B, Landt O, et al. Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: The two facets of a Janus obesity gene. *Hum Mol Genet*. 2007;16(15):1837–44.
93. Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Int J Epidemiol*. 2013;42(5):1215–22.
94. Stöger R. The thrifty epigenotype: An acquired and heritable predisposition for obesity and diabetes? *BioEssays*. 2008;30(2):156–66.
95. Haslam DW, James WPT. Obesity. In: *Lancet*. 2005. p. 1197–209.
96. de Onis M, Blössner M, Borghi E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr*. 2010 Nov;92(5):1257–64.
97. Ministério da Saúde. Obesidade infantil traz riscos para a saúde adulta [Internet]. 2019 [citado em 17 out 2019]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45494-obesidade-infantil-traz->

riscos-para-a-saude-adulta

98. Veríssimo MDLÓR, Fonseca RMGS da. O cuidado da criança segundo trabalhadoras de creches. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2003 Fev;11(1):28–35.
99. Oliveira CB, Tolocka RE, Marco A. Obesidade infantil, prevenção e intervenção. Uma revisão de literatura. *EFDeportes.com, Revista Digital [Internet]*. 2012 [citado em 05 out 2019];17(167). Disponível em: <https://www.efdeportes.com/efd167/obesidade-infantil-prevencao-e-intervencao.htm>.
100. Mendonça CP, Anjos LA dos. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. *Cad Saude Publica*. junho de 2004;20(3):698–709.
101. Rinaldi AEM, Pereira AF, Macedo CS, Mota JF, Burini RC. Contribuições das práticas alimentares e inatividade física para o excesso de peso infantil. *Rev Paul Pediatr*. 2008 Sep;26(3):271–7.
102. Escobar AM de U, Valente MH. Sobrepeso: uma nova realidade no estado nutricional de pré-escolares de Natal, RN. *Rev Assoc Med Bras*. 2007;53(5):378–379.
103. Moreira Lima Verde SM. Obesidade infantil: o problema de saúde pública do século 21. *Rev Bras em promoção da Saúde*. 2014;27(1):1–2.
104. Henriques P, O'Dwyer G, Dias PC, Barbosa RMS, Burlandy L. Políticas de Saúde e de Segurança Alimentar e Nutricional: desafios para o controle da obesidade infantil. *Cien Saude Colet*. 2018;23(12):4143–52.
105. Al-Khudairy L, Loveman E, Colquitt JL, Mead E, Johnson RE, Fraser H, et al. Diet, physical activity and behavioural interventions for the treatment of overweight or obese adolescents aged 12 to 17 years. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017;6:CD012691.
106. Mead E, Brown T, Rees K, Azevedo LB, Whittaker V, Jones D, et al. Diet, physical activity and behavioural interventions for the treatment of overweight or obese children from the age of 6 to 11 years. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;6:CD012651.
107. Bhaskaran K, Douglas I, Forbes H, Dos-Santos-Silva I, Leon DA, Smeeth L. Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5.24 million UK adults. *Lancet*. 2014 Aug;384(9945):755–65.
108. Kipping RR, Jago R, Lawlor DA. Obesity in children. Part 1: Epidemiology, measurement, risk factors, and screening. *BMJ*. 2008;337:a1824.
109. NHS Digital. NHS England 2014: Chapter 10, Children's body mass index, overweight and obesity [Internet]. Leeds (RU); 16 dez 2015 [revisado 3 mai 2018; citado 17 out 2019]. Disponível em: <https://digital.nhs.uk/data-and->

information/publications/statistical/health-survey-for-england/health-survey-for-england-2014.

110. Public Health England. Childhood Obesity: Applying all our Health [Internet]. London: Government of the United Kingdom; 2015; [24 out 2019; citado 17 out 2019]. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/publications/childhood-obesity-applying-all-our-health>.
111. Adelantado-Renau M, Esteban-Cornejo I, Rodriguez-Ayllon M, Cadenas-Sanchez C, Gil-Cosano JJ, Mora-Gonzalez J, et al. Inflammatory biomarkers and brain health indicators in children with overweight and obesity: The ActiveBrains project. *Brain Behav Immun*. 2019;81:588–597.
112. Pervanidou P, Bastaki D, Chouliaras G, Papanikolaou K, Laios E, Kanaka-Gantenbein C, et al. Circadian cortisol profiles, anxiety and depressive symptomatology, and body mass index in a clinical population of obese children. *Stress*. 2013 Jan;16(1):34–43.
113. Roth B, Munsch S, Meyer A, Isler E, Schneider S. The association between mothers' psychopathology, childrens' competences and psychological well-being in obese children. *Eat Weight Disord - Stud Anorexia, Bulim Obes*. 2008 Sep;13(3):129–36.
114. Epstein LH, Klein KR, Wisniewski L. Child and parent factors that influence psychological problems in obese children. *Int J Eat Disord*. 1994;15(2):151–8.
115. Epstein LH, Wisniewski L, Weng R. Child and Parent Psychological Problems Influence Child Weight Control. *Obes Res*. 1994;2(6):509–15.
116. Decaluwé V, Braet C, Moens E, Van Vlierberghe L. The association of parental characteristics and psychological problems in obese youngsters. *Int J Obes*. 2006;30(12):1766–74.
117. Zeller MH, Saelens BE, Roehrig H, Kirk S, Daniels SR. Psychological adjustment of obese youth presenting for weight management treatment. *Obes Res*. 2004;12(10):1576–86.
118. Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012;58(1):5.61.1–5.61.18.
119. Johnson PR, Hirsch J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. *J Lipid Res*. 1972 Jan;13(1):2–11.
120. Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronis MJJ, Badger TM. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2008 Feb;294(2):R528–38.
121. Shankar K, Zhong Y, Kang P, Borengasser SJ, Ronis MJ, Badger TM. Enhanced Adipogenic and Lipogenic Signatures in White Adipose Tissue of Offspring Exposed to Maternal Obesity In Utero. In 2011. p. OR31-4-OR31-4.

122. Almeida MM, Dias-Rocha CP, Souza AS, Muros MF, Mendonca LS, Pazos-Moura CC, et al. Perinatal maternal high-fat diet induces early obesity and sex-specific alterations of the endocannabinoid system in white and brown adipose tissue of weanling rat offspring. *Br J Nutr.* 2017;118(10):788–803.
123. Butruille L, Marousez L, Pourpe C, Oger F, Lecoutre S, Catheline D, et al. Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring. *Int J Obes.* 2019;43(12):2381–2396.
124. Carvalho ALO, Ferri BG, de Sousa FAL, Vilela FC, Giusti-Paiva A. Early life overnutrition induced by litter size manipulation decreases social play behavior in adolescent male rats. *Int J Dev Neurosci [Internet].* 2016;53:75–82. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.07.005>.
125. Davidowa H, Plagemann A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport.* 2007;18(5):521–4.
126. Velkoska E. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *AJP Endocrinol Metab [Internet].* 2005;288(6):E1236–43. Disponível em: <http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.00505.2004>.
127. Hou M, Liu Y, Zhu L, Sun B, Guo M, Burén J, et al. Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. *PLoS One.* 2011;6(11):1–9.
128. Udo MSB, Sandini TM, Reis TM, Bernardi MM, Spinosa HS. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2014;45:27–33.
129. Rocha P, Ribeiro M, Sandini T, Ricci-Adari Camargo E, Bernardi M, Spinosa H. Perinatal glyphosate-based herbicide impaired maternal behavior by reducing the striatal dopaminergic activity and delayed the offspring reflex development. *Atas Saúde Ambient.* 2019;7:130–56.
130. Mendes-Lima T, Kirsten TB, Felicio LF, Teodorov E, Queiroz-Hazarbassanov N, Bernardi MM. Acute Lipopolysaccharide Switches the Selection of Maternal Behavior to Predatory Behavior in Female Rats. *Neuroimmunomodulation.* 2017;24(1):1–10.
131. Sandini TM, Udo MSB, Reis-Silva TM, Bernardi MM, Spinosa H de S. Prenatal exposure to integerrimine N-oxide impaired the maternal care and the physical and behavioral development of offspring rats. *Int J Dev Neurosci.* 2014;36:53–63.
132. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 1934;18(3):385–403.

133. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Anim Behav.* 1973;21(2):205–35.
134. Joaquim AO, Coelho CP, Motta PD, Bondan EF, Teodorov E, Martins MFM, et al. Transgenerational effects of a hypercaloric diet. *Reprod Fertil Dev.* 2017;29(2):325–335.
135. Bernardis LL. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's "nutritive ratio" in rats with hypothalamic obesity. *Experientia.* 1970;26(7):789–90.
136. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007;41(1):111–9.
137. Hoath SB. Treatment of the neonatal rat with epidermal growth factor: Differences in time and organ response. *Pediatr Res.* 1986;20(5):468–72.
138. Reis-Silva M, Cohn DH, Sandini TM., Udo MSB, Teodorov E, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide exposure affects sexual dimorphism in different germlines of mice with a depressive phenotype. *Life Sci.* 2016;149:129–37.
139. Kuleskaya N, Voikar V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. *Physiol Behav.* 2014;133:30–8.
140. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1977;229:327–36.
141. Castagné V, Moser P, Roux S, Porsolt RD. Rodent models of depression: Forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci.* 2011;Chapter 8:Unit 8.10^a.
142. Xavier JLP, Scomparin DX, Pontes CC, Ribeiro PR, Cordeiro MM, Marcondes JA, et al. Litter Size Reduction Induces Metabolic and Histological Adjustments in Dams throughout Lactation with Early Effects on Offspring. *An Acad Bras Cienc.* 2019 Mar;91(1):e20170971.
143. Šefčková Z, Bujňáková D, Raček L, Kmet' V, Mozeš Š. Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests. *Physiol Res.* 2011;69(2):337–46.
144. Sousa FGM de, Araújo TL de. Avaliação nutricional de crianças de seis a sessenta meses. *Rev Bras Enferm.* 2004 Oct;57(5):534–6.
145. Silugem D, Devinvenzi M, Lessa A. Diagnóstico do estado nutricional da criança e do adolescente. *J pediatr (Rio J).* 2000;76 (supl 3(supl 3):275–83.
146. Oliveira de Lira, L; Oliveira LS; Araujo CRB; Silva MC; Manhães-de-Castro R; Souza SL. Overnutrition in lactation: effects on somatic and sensorimotor

- development in rats. *Neurobiologia*. 2014;77(5):27.
147. Bautista A, García-Torres E, Prager G, Hudson R, Rödel HG. Development of behavior in the litter huddle in rat pups: Within- and between-litter differences. *Dev Psychobiol*. 2010;52(1):35–43.
 148. Romani S de AM, Lira PIC de. Fatores determinantes do crescimento infantil. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2004 Mar;4(1):15–23.
 149. Bernstein RM, Hinde K. Bioactive factors in milk across lactation: Maternal effects and influence on infant growth in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am J Primatol*. 2016 Aug;78(8):838–50.
 150. Khodabakhshi A, Mehrad-Majd H, Vahid F, Safarian M. Association of maternal breast milk and serum levels of macronutrients, hormones, and maternal body composition with infant's body weight. *Eur J Clin Nutr*. 2018 Mar;72(3):394–400.
 151. Lu M, Jiang J, Wu K, Li D. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α in human milk of different lactation stages and different regions and their relationship with maternal diet. *Food Funct*. 2018;9(2):1199–204.
 152. Derynck R. The physiology of transforming growth factor- α . In: Woude GFV, Klein G, editors. *Advances in cancer Research*. San Diego, California: Academic Press, Inc; 1992. p. 27–48.
 153. Numan M, Fleming A, Levy F. Maternal Behavior. In: KE, editor. *Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd; 2006. p. 1921–93.
 154. Teodorov E, Felício LF, Bernardi MM. Maternal Behavior. In: Andersen M, Tufick S, editors. *Animal models as Ethical tools in Biomedical rRsearch*. São Paulo: CLR Balieiro Editores; 2010. p. 149–62.
 155. Numan M. A neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. *Acta Paediatr Suppl*. 1994;397(Suppl 397):19–28.
 156. MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*. 1981 Mar;211(4488):1294–302.
 157. Spruijt BM, Van Hooff JARAM, Gispen WH. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev*. 1992;72(3):825–52.
 158. Berridge KC. Comparative Fine Structure of Action: Rules of Form and Sequence in the Grooming Patterns of Six Rodent Species. *Behaviour*. 1990;113(1–2):21–56.
 159. Eckstein RA, Hart BL. Grooming and control of fleas in cats. *Appl Anim Behav Sci*. 2000;68(2):141–50.
 160. Kalueff A V., Tuohimaa P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural

- stress research. *Brain Res Protoc.* 2004;13(3):151–8.
161. Meshalkina DA, Kalueff A V. Commentary: Ethological Evaluation of the Effects of Social Defeat Stress in Mice: Beyond the Social Interaction Ratio. *Front Behav Neurosci.* 2016;9:364.
 162. Rivier C. Effect of Peripheral and Central Cytokines on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis of the Rat. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;697:97-105.
 163. Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull.* 1976 May;83(3):482–504.
 164. Bernardi MM, Scavone C, Frussa-Filho R. Differential effects of single and long-term amphetamine and apomorphine administrations on locomotor activity of rats. *Gen Pharmacol.* 1986;17(4):465–8.
 165. Lynn DA, Brown GR. The ontogeny of exploratory behavior in male and female adolescent rats (*Rattus norvegicus*). *Dev Psychobiol.* 2009;51(6) 513-(6):513–20.
 166. Mun HS, Lipina TV., Roder JC. Ultrasonic Vocalizations in Mice During Exploratory Behavior are Context-Dependent. *Front Behav Neurosci.* 2015;9:316.
 167. Ortet G, Ibáñez MI. Open-field exploration and emotional reactivity in mice. *Psicothema.* 1999;11(1):75–81.
 168. Satinder KP. A Note on the Correlation Between Open-Field and Escape-Avoidance Behavior in the Rat. *J Psychol Interdiscip Appl.* 1968;134(1-2):49–5.
 169. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res.* 2002;134(1–2):49–57.
 170. Whimbey a E, Denenberg VH. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. *J Comp Physiol Psychol.* 1967;63(3):500–4.
 171. Crusio WE, Schwegler H, van Abeelen JHF. Behavioral responses to novelty and structural variation of the hippocampus in mice. I. Quantitative-genetic analysis of behavior in the open-field. *Behav Brain Res.* 1989;32(1):75–80.
 172. Bernardi MMM, De Souza H, Palermo Neto J, Neto JP. Effects of single and long-term haloperidol administration on open field behavior of rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1981;73(2):171–5.
 173. Henning SJ. Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab Gastrointest Physiol.* 1978;4:5.
 174. Viau V, Sharma S, Meaney MJ. Changes in plasma adrenocorticotropin,

- corticosterone, corticosteroid-binding globulin, and hippocampal glucocorticoid receptor occupancy/translocation in rat pups in response to stress. *J Neuroendocrinol.* 1996;8(1):1–8.
175. Walker CD, Dallman MF. Neonatal facilitation of stress-induced adrenocorticotropin secretion by prior stress: Evidence for increased central drive to the pituitary. *Endocrinology.* 1993;132(3):1101–7.
176. Walker CD, Scribner KA, Cascio CS, Dallman MF. The Pituitary-Adrenocortical System of Neonatal Rats Is Responsive to Stress throughout Development in a Time-Dependent and Stressor-Specific Fashion. *Endocrinology.* 1991;128(3):1385–95.
177. Levine S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. *Physiol Behav.* 2001 Jun;73(3):255–60.
178. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977;266:730–2.
179. Beijamini V, Skalisz LL, Joca SRL, Andreatini R. The effect of oxcarbazepine on behavioural despair and learned helplessness. *Eur J Pharmacol.* 1998 Apr;347(1):23–7.
180. Contreras CM, Martínez-Mota L, Saavedra M. Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 1998;22(7):1121–1128.
181. Martí J, Armario A. Effects of diazepam and desipramine in the forced swimming test: influence of previous experience with the situation. *Eur J Pharmacol.* 1993 May;236(2):295–9.
182. Bolton, JL BS, Bilbo SD. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues Clin Neurosci.* 2014;16(3):307–20.
183. Jantaratnotai N, Mosikanon K, Lee Y, McIntyre RS. The interface of depression and obesity. *Obesity Research and Clinical Practice.* 2017;11(1):1–10.
184. Marques AH, Cizza G, Sternberg E. Interações imunocerebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos. *Rev Bras Psiquiatr.* 2007;29(Supl 1):s27–s32.
185. Hryhorczuk C, Sharma S, Fulton SE. Metabolic disturbances connecting obesity and depression. *Frontiers in Neuroscience.* 2013;7:177.
186. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2001;60(03):329–39.
187. Kang YE, Kim JM, Joung KH, Lee JH, You BR, Choi MJ, et al. The roles of

adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction. *PLoS One*. 2016;11(4):e0154003.



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada **"MODELO DE HIPERNUTRIÇÃO NEONATAL INDUZ SOBREPESO, COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E AUMENTA OS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-1 β NA IDADE PRÉ-PÚBERE DE RATOS**", registrada com o nº 005/18, sob-responsabilidade de MARIA MARTHA BERNARDI e ANA CLAUDIA SILVA SAMPAIO que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais (CEUA) da UNIP, em reunião de 21/02/2018.

Finalidade	Ensino ()	Pesquisa Científica (x)
Vigência de autorização		01/03/2018 01/10/2020
Espécie / linhagem/ raça		RATO ISOGENICO
Nº de animais		100
Peso / idade		30-250G/ADULTOS/ JOVENS
Sexo		MACHO/FEMEA
Origem		DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA DA USP

Juliana Guizi

Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Universidade Paulista – UNIP