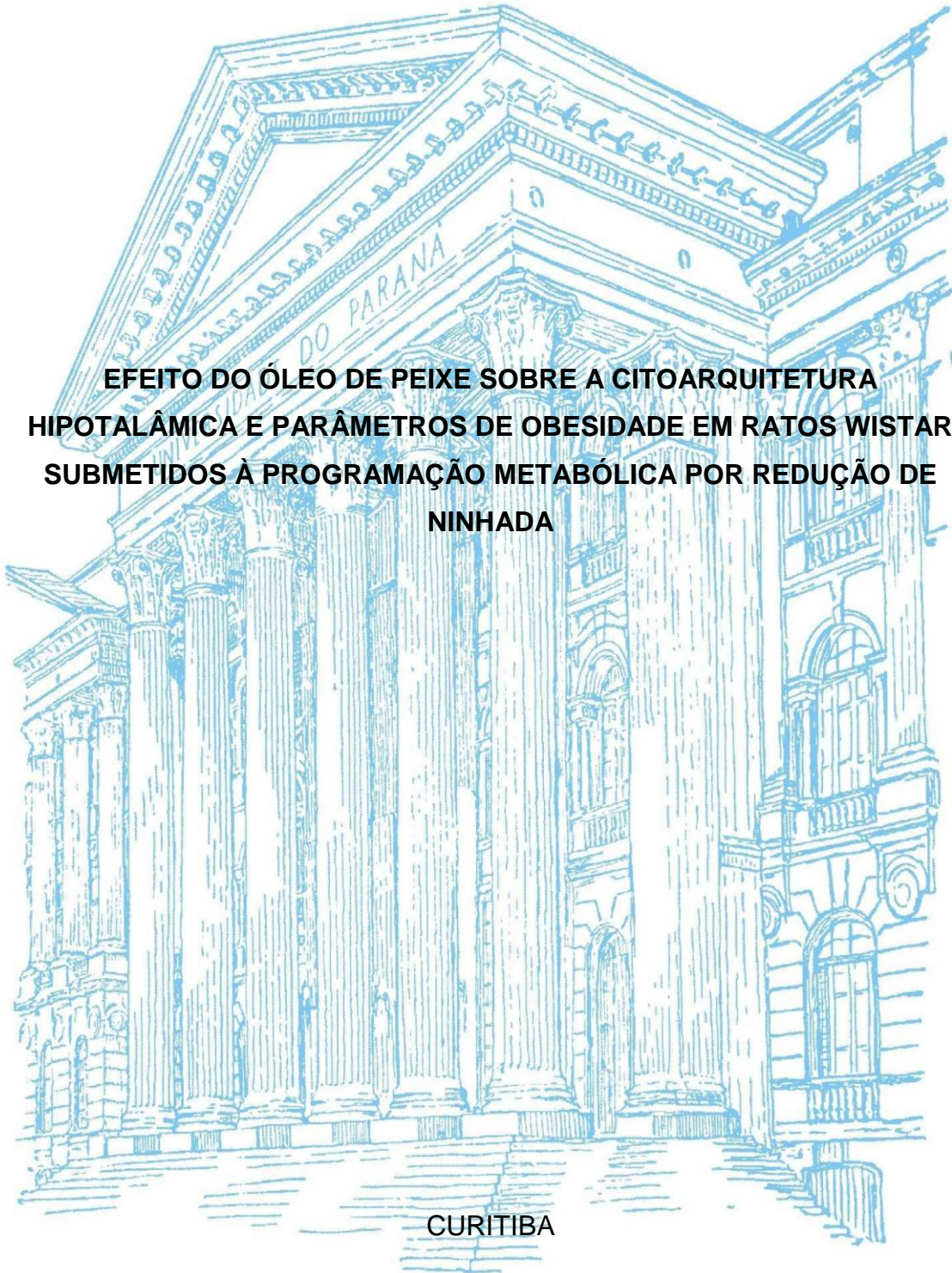


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA APARECIDA COMOTTI DE OLIVEIRA

**EFEITO DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE A CITOARQUITETURA
HIPOTALÂMICA E PARÂMETROS DE OBESIDADE EM RATOS WISTAR
SUBMETIDOS À PROGRAMAÇÃO METABÓLICA POR REDUÇÃO DE
NINHADA**



CURITIBA

2017

BRUNA APARECIDA COMOTTI DE OLIVEIRA

**EFEITO DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE A CITOARQUITETURA
HIPOTALÂMICA E PARÂMETROS DE OBESIDADE EM RATOS WISTAR
SUBMETIDOS À PROGRAMAÇÃO METABÓLICA POR REDUÇÃO DE
NINHADA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Katya Naliwaiko

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Djanira Aparecida da Luz Veronez

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Oliveira, Bruna Aparecida Comotti de
Efeito do óleo de peixe sobre a citoarquitetura hipotalâmica e parâmetros de obesidade em ratos Wistar submetidos à programação metabólica por redução de ninhada. / Bruna Aparecida Comotti de Oliveira. – Curitiba, 2017.
62 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Katya Naliwaiko
Co-orientadora: Djanira Aparecida da Luz Veronez
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Obesidade. 2. Hipotalamo. 3. Oleo de peixe. 4. Metabolismo. I. Título II. Naliwaiko, Katya. III. Veronez, Djanira Aparecida da Luz. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 613.2

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



ATA DA 417ª SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aos vinte e oito dias do mês de Março de dois mil e dezessete, às 14h00min, no Anfiteatro 03 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos professores: Drs. Dionizia Xavier Scomparin (Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG), Maritana Mela Prodocimo (Universidade Federal do Paraná - UFPR), e Katya Naliwaiko (Universidade Federal do Paraná, como orientadora e presidente da Banca Examinadora), com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **Bruna Aparecida Comotti de Oliveira**, intitulada: "Implicações do modelo da programação metabólica sobre a citoarquitetura hipotalâmica e parâmetros de obesidade. Como a suplementação com óleo de peixe pode influenciar neste cenário?", para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular. A candidata teve em torno de 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação e cada examinador, teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de mais 30 (trinta) minutos para resposta do candidato ou de 60 (sessenta) minutos, quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pela orientadora, Dra. Katya Naliwaiko. Após analisar a dissertação e arguido a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela "APROVAÇÃO", habilitando-a ao título de Mestre em Biologia Celular e Molecular. A emissão do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Examinador/Afiliação

Parecer

Assinatura

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

Favorável

[Assinatura]

Profa. Dra. Dionizia Xavier Scomparin
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Favorável

[Assinatura]

Profa. Dra. Maritana Mela Prodocimo
Universidade Federal do Paraná

Favorável

[Assinatura]

À minha mãe que me deu a vida e guiou
meus passos. Ao meu esposo, que me
dá a confiança para sempre sonhar.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr.^a katya Naliwaiko, por ter me acolhido e orientado com muitos ensinamentos científicos e atenção, dispondo de uma grande amizade. Sou eternamente grata pela oportunidade e confiança para realizar este trabalho.

À minha querida amiga de bancada MSc. Stefani Fischer, que com muita paciência me estendeu a mão e se dispôs em ajudar no que fosse possível e compartilhar do seu conhecimento.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, que gentilmente abriu as portas do seu laboratório e dissipou de grandes ensinamentos com sua enorme sabedoria profissional e científica.

À Prof. Dr.^a. Marcia Helena Appel, que prontamente esteve presente a me ajudar e compartilhar da sua grande experiência. E pela amizade construída.

À Prof. Dr.^a. Djanira Veronez, por ter cedido seus equipamentos e pela coorientação nos aspectos ligado á estereologia dos núcleos hipotalâmicos.

Ao Rodrigo Schuh e Sr. Nino, pela ajuda na obtenção dos cortes histológicos e coloração.

Às amigas Juliana Schleder, Dagliane Pagliosa, Débora Coutinho, Juliana Beker, Camila Marques e ao Igor Pedroso, por toda ajuda na bancada, em experimento e manipulação animal. Vocês foram essenciais.

À todos os amigos, pesquisadores e professores do Laboratório de Metabolismo Celular. Obrigada por trabalhar com vocês.

À querida MSc. Maria da Graça Toledo, pela atenção e por tonar possível as análises lipídicas por HPLC, na Central Analítica do Departamento de Farmácia no campus Jardim Botânico da UFPR.

À Naturalis Nutrição & Farma Ltda que gentilmente doou as cápsulas de óleo de peixe usadas neste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

À UFPR pelo ensino através de seus grandes professores.

Ao Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo conhecimento adquirido e pelos amigos que pude fazer.

Ao meu amado esposo Mateus, que não somente acompanhou até o desfecho deste trabalho, mas contribuiu me ensinando a manusear o software de desenho autoCAD.

À toda minha família, por todos os sábios ensinamentos, pela educação e suporte em toda minha caminhada até aqui. E pela presença mesmo na distância.

Em especial as minhas tias: Elaine Daffara, que sempre foi o meu espelho e a Cida Comotti, por me mostrar o quanto podemos ser fortes.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

A obesidade é uma doença de causa multifatorial determinada por fatores genéticos e ambientais. Após a industrialização dos alimentos, o perfil lipídico da dieta em humanos foi drasticamente alterado, provocando aumento do consumo de alimentos com gorduras saturadas e do tipo trans, o que causou em longo prazo sobrepeso da população. O período de lactação é um momento crucial no estabelecimento do comportamento alimentar e desta forma, superalimentação nesse período pode predispor o organismo ao desenvolvimento de comorbidades como a obesidade e diabetes. Neste trabalho, investigamos o efeito da programação metabólica por redução de ninhada sobre possíveis alterações morfológicas no hipotálamo, parâmetros de obesidade, além de investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe rico em AGPI's n-3 sobre esses parâmetros. Para isso, foram utilizados ratos Wistar que, ao 3º dia pós-natal, tiveram suas ninhadas reduzidas para três animais caracterizando o grupo obeso, enquanto as ninhadas controle foram mantidas com 10 animais. Após o desmame, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: controle (CON), controle suplementado (CONS), obeso (OB) e obeso suplementado (OBS) e iniciou-se a suplementação diária com 1g/kg/dia de óleo de peixe. A massa corporal dos animais foi avaliada durante o período de em 7, 14 e 21 dias e, posteriormente, até o final do experimento. Para avaliação da obesidade foi calculado o índice de Lee aos 21 e 60 dias, e avaliados os panículos adiposos da cavidade abdominal (retroperitoneal, mesentérica e perigonadal). Parâmetros séricos como glicemia, lipidemia e perfil lipídico foram mensurados. Uma vez estabelecido o quadro de obesidade, os encéfalos dos animais foram processados histologicamente e submetidos à análise estereológica dos núcleos hipotalâmicos relacionados ao controle de ingestão e saciedade, núcleo arqueado (ARC), paraventricular (PV) e área hipotalâmica lateral (LHA). Os resultados demonstram que o modelo da programação metabólica foi hábil em estabelecer um padrão de obesidade nos animais de ninhada reduzida, entretanto essas alterações sistêmicas não foram acompanhadas de alterações da citoarquitetura dos núcleos hipotalâmicos. Esse quadro foi acompanhado de alterações em depósitos adiposos e em parâmetros séricos, que caracterizam o quadro. De forma interessante, a suplementação reverteu os parâmetros dos panículos adiposos, entretanto não provocou significativa melhora nos parâmetros séricos. Acreditamos que esses resultados devam-se ao curto tempo de suplementação. Desta forma, conclui-se que o modelo de programação metabólica produz alterações metabólicas que se relacionam com o quadro de obesidade, sem alterar a organização celular do hipotálamo.

Palavras chave: Obesidade, programação metabólica, hipotálamo e óleo de peixe.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial disease caused by genetic and environmental factors. After the industrialization of food, the lipid profile of the diet in humans was drastically altered, causing an increase in the consumption of foods with saturated fats and trans type, which caused in the long term overweight of the population. The lactation period is a crucial moment in the establishment of eating behavior and thus overfeeding in this period may predispose the body to the development of comorbidities such as obesity and diabetes. In this work, we investigated the effect of metabolic programming by litter reduction on possible morphological changes in the hypothalamus, obesity parameters, and investigated the effect of supplementation with fish oil rich in n-3 PUFAs on these parameters. For this, Wistar rats were used, which on the 3rd postnatal day had their litters reduced to three animals characterizing the obese group, while the control litters were maintained with 10 animals. After weaning, the animals were divided into 4 experimental groups: control (CON), supplemented control (CONS), obese (OB) and supplemented obese (OBS), and daily supplementation with 1g/kg/day of fish. The body mass of the animals was evaluated during the period of 7, 14 and 21 days, and thereafter until the end of the experiment. For the evaluation of obesity, the Lee index was calculated at 21 and 60 days, and the adipose tissue of the abdominal (retroperitoneal, mesenteric and perigonadal) cavity was evaluated. Serum parameters such as blood glucose, triglycerides and lipid profile were measured. Once the obesity was established, the animals' brains were processed histologically and submitted to stereological analysis of the hypothalamic nuclei related to the ingestion and satiety control, arcuate nucleus (ARC), paraventricular (PV) and lateral hypothalamic area (LHA). The results demonstrate that the model of metabolic programming was able to establish a pattern of obesity in the animals of reduced litter, however these systemic alterations are not accompanied by changes in the cytoarchitecture of hypothalamic nuclei. This situation was accompanied by alterations in fatty deposits and in serum parameters that characterize the condition. Interestingly, supplementation may reverse the parameters of adipose tissue, but it didn't cause a significant improvement in serum parameters. We believe that these results are due to the short time of supplementation. In this way, it is concluded that the metabolic programming model produces metabolic changes that are related to the obesity scenario, without altering the cellular organization of the hypothalamus.

Key words: Obesity, metabolic programmed, hypothalamus and fish oil.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DE LEITE OBTIDAS DE RATAS PROGENITORAS CONTROLE E OBESO.....	29
TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DE PLASMA DOS RATOS DOS GRUPOS CONTROLE, CONTROLE SUPLEMENTADO, OBESO E OBESO SUPLEMENTADO.....	36
TABELA 3 - DENSIDADE POR ÁREA (NA) DOS NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS DE RATOS CONTROLE, CONTROLE SUPLEMENTADO, OBESO E OBESO SUPLEMENTADO.	39
TABELA 4 - DENSIDADE NUMÉRICA (NV) DOS NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS DE RATOS CONTROLE, CONTROLE SUPLEMENTADO, OBESO E OBESO SUPLEMENTO.	41
TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DO CÓRTEX CEREBRAL DOS RATOS DOS GRUPOS CONTROLE, CONTROLE SUPLEMENTADO, OBESO E OBESO SUPLEMENTADO..	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DESENHO EXPERIMENTAL EM DIAS.....	16
FIGURA 2 - ILUSTRAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	17
FIGURA 3 - ANATOMIA DA FORMAÇÃO HIPOTALÂMICA E SEUS NÚCLEOS.....	22
FIGURA 4 - IMAGEM HISTOLÓGICA DO NÚCLEO PV COM O DISSECTOR FÍSICO (VERMELHO) E O MARCADOR (AMARELO).	24
FIGURA 5 - CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE OBESIDADE DURANTE O PERÍODO LACTACIONAL.....	27
FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DO LEITE DE RATAS PROGENITORAS.....	28
FIGURA 7 - EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL E O CONSUMO ALIMENTAR ASSOCIADO À PROGRAMAÇÃO METABÓLICA E AO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM O ÓLEO DE PEIXE.....	31
FIGURA 8 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO EM ANIMAIS OBESOS.....	33
FIGURA 9 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO SOBRE PARÂMETROS SÉRICOS EM ANIMAIS OBESOS AOS 60 DIAS.	34
FIGURA 10 - IMAGEM HISTOLÓGICA DA ÁREA HIPOTALÂMICA.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Ácido Araquidônico

AGPI's - Ácidos Graxos Poliinsaturados

AgRP - Peptídeo Relacionado ao gene Agouti

ALA - Ácido α - linolênico

ARC - Núcleo Arqueado

ANOVA – Análise de Variância

CART - Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina

CNA - Comprimento Naso Anal

CON - Controle

CONS - Controle Suplementado

DHA - Ácido Docosahexaenóico

DMH - Núcleo Dorsomedial

EPA - Ácido Eicosapentaenóico

GMS - Glutamato Monossódico

HPA - Eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal

LA - Ácido Linoleico

LHA - Área Hipotalâmica Lareral

n-3 - Ômega 3

n-6 - Ômega 6

NPY - Neuropeptídeo Y

OB - Obeso

OBS - Obeso Suplementado

OMS - Organização Mundial da Saúde

PV - Núcleo Paraventricular

POMC - Pró Ópio Melanocortina

RI - Resistência à Insulina

SNC - Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	OBESIDADE.....	1
1.2	O HIPOTÁLAMO.....	3
1.3	MODELOS ANIMAS PARA O ESTUDO DA OBESIDADE.....	6
1.3.1	O modelo da programação metabólica por redução de ninhada.....	6
1.4	OBESIDADE E DIETAS OCIDENTAIS.....	8
1.5	ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS.....	9
1.6	ÁCIDOS GRAXOS E SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	COMITÊ DE ÉTICA.....	15
3.2	OBTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	15
3.3	INDUÇÃO DA OBESIDADE POR REDUÇÃO DE NINHADA.....	16
3.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	17
3.5	ORDENHA DO LEITE.....	18
3.6	ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DO LEITE.....	18
3.7	SUPLEMENTAÇÃO.....	18
3.8	EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL.....	19
3.9	AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO.....	19
3.10	AVALIAÇÃO DA OBESIDADE.....	19
3.10.1	Índice de Lee (IL).....	19
3.10.2	Peso das gorduras abdominais viscerais.....	19
3.11	ANÁLISE BIOQUÍMICA DO PLASMA.....	20
3.12	PERFIL LIPÍDICO E CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA.....	20
3.13	MICROSCOPIA DE LUZ.....	22
3.14	COLORAÇÃO DE NISSL.....	22
3.15	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA.....	23
3.16	ANALISE ESTATÍSTICA.....	25
4	RESULTADOS.....	26
4.1	EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL DURANTE A LACTAÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	26

4.1.1	Evolução do peso dos filhotes no período de lactação.....	26
4.1.2	Composição do leite.....	28
4.2	EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL ASSOCIADA AO CONSUMO ALIMENTAR E EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO.....	30
4.3	ALTERAÇÕES DOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS DECORRENTES DA OBESIDADE E EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO.....	32
4.4	COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO PLASMA.....	35
4.5	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HIPOTALÂMICAS.....	37
4.5.1	Análise estereológica dos núcleos hipotalâmicos: área hipotalâmica lateral, arqueado e paraventricular.....	37
4.5.2	Densidade por área (Na).....	38
4.5.3	Densidade numérica (Nv).....	40
4.5.4	Concentração de ácidos graxos no córtex cerebral.....	42
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÃO.....	49
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
8	ANEXO.....	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

Ao longo da evolução, os organismos mamíferos assim como outras espécies desenvolveram a habilidade de estocar energia como estratégia para garantir sua sobrevivência após passar por períodos críticos de escassez de nutrientes. Desta forma, as calorias não consumidas de forma imediata passaram a ser estocadas no tecido adiposo (BALISTRERI et al., 2010; LAFLAMME, 2012). Neste tecido, as células são capacitadas em armazenar gotículas de lipídios na forma de triacilglicerol, por todo seu citoplasma, sem que a célula sofra alterações funcionais (AHIMA & FLIER, 2000; CHUNG & LEIBEL, 2005).

A vida moderna trouxe uma variada gama de alimentos, com significativo teor de calorias e palatabilidade. Como consequência, as últimas gerações apresentaram um aumento do estoque energético devido à ingestão de alimentos altamente calóricos, acompanhados de sedentarismo. Este cenário produziu o expressivo aumento na prevalência da obesidade, acometendo de maneira generalizada em diferentes populações mundiais e classes sociais. Atualmente a OMS, considera a obesidade uma epidemia global (COTTRELL & OZANNE, 2007; SUZUKI et al., 2012, SEGOVIA et al., 2014). O aumento da ingestão de dietas calóricas associada ao sedentarismo, não somente provoca a instalação do quadro de obesidade, como de outras comorbidades associadas, tais como a resistência periférica à insulina (RI), diabetes tipo II, hipertensão arterial, intolerância à glicose, dislipidemias e doenças cardiovasculares. A instalação de um quadro de obesidade associada à ocorrência de duas ou mais patologias, é considerado como síndrome metabólica (SM), e sua prevalência tem se tornado cada vez mais comum. A síndrome metabólica está associada a um risco aumentado de eventos cardiovasculares e mortalidade (WAJCHENBERG, 2000; YANG & SMITH, 2007).

A revolução industrial foi responsável por produzir um aporte de gorduras saturadas e do tipo trans aos alimentos, fato que provocou alterações significativas no perfil lipídico da dieta humana devido ao maior consumo dessas gorduras (SIMOPOULOS, 2011). Essas alterações da dieta se refletiram na composição lipídica das membranas celulares e conseqüentemente, podem ser relacionadas com alterações de funcionalidade em diversos sistemas fisiológicos. Desde a década passada, tais alterações da dieta têm sido correlacionadas com o aumento da prevalência de diversas patologias inclusive aquelas relacionadas aos sistemas cardiovascular e nervoso (YOU DIM et al., 2000; SHAPIRO, 2003).

A Organização Mundial da Saúde aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A projeção é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões obesos. Mundialmente a prevalência da obesidade tem aumentado de maneira significativa desde 1980. Em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso, o equivalente a 39 % de toda população adulta. Destes mais de 600 milhões eram obesos. O aumento da obesidade entre crianças é alarmante (ROCCHINI, 2002), e sua prevalência dobrou nas duas últimas décadas em muitos países. Segundo as estatísticas, 42 milhões de crianças com 5 anos estavam acima do peso ou obesos em 2013 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Tais números fazem com que hoje seja considerado um problema mundial de saúde pública (ONIS & BLÖSSNER, 2000; LOBSTEIN et al., 2004).

1.2 O HIPOTÁLAMO

O hipotálamo ocupa a porção ventral do diencéfalo e desempenha suas funções de forma articulada através de diversos circuitos neurais que se comunicam com: áreas corticais de controle - que se encarregam dos estados motivacionais, sistemas motores somáticos - que comandam os comportamentos correspondentes; e sistemas eferentes neurais e humorais - que realizam as ações fisiológicas reguladoras sobre interações neuroimunoendócrinas (BOURET, 2009), desempenha papel fundamental no controle neural da ingestão e gasto de energia, através de um complexo circuito de neurotransmissores e neuromoduladores, onde o hipotálamo figura como a principal estrutura anatômica envolvida no processo (STANLEY et al., 2005; KENNY, 2011).

Para manutenção de equilíbrio energético adequado, é necessário regular o comportamento alimentar com base nas reservas energéticas e sua velocidade de reposição (RINALDI et al., 2012). A conexão entre comportamento alimentar e lipídios é dada através da comunicação entre o tecido adiposo e o encéfalo por comunicação endócrina através do hormônio leptina. Quando neurônios do hipotálamo (NPY e AgRP) detectam redução nas concentrações de hormônio liberado pelos adipócitos, há o estímulo da ingestão de alimentos (BOURET & SIMERLY, 2007; PAZ-FILHO, 2016).

Na gênese da obesidade está o desequilíbrio na modulação do apetite, o que provoca desbalanço entre o consumo e gasto de energia em direção ao aumento do consumo (BERTHOUD & MORRISON, 2008). Atualmente muito tem se investigado sobre os mecanismos reguladores da saciedade e gasto energético, no sentido de compreender a relevância fisiológica desses sistemas e o papel que desempenham nos distúrbios da obesidade (ZHU et al., 2015; PAZ-FILHO, 2016).

A disfunção da atividade hipotalâmica, no que tange o controle da fome e da saciedade, implica num importante mecanismo no desenvolvimento da

obesidade (PLAGEMANN et al., 1999; MCMILLEN et al., 2005). O controle do balanço energético de animais e seres humanos é realizado pelo sistema nervoso central (SNC) por meio de conexões neuroendócrinas, em que hormônios periféricos, como a leptina e a insulina, atuam sobre neurônios especializados do hipotálamo informando sobre os estoques de gordura do organismo e induzindo respostas apropriadas para a manutenção desses estoques (BOURET & SIMERLY, 2007; VELLOSO & SCHWARTZ, 2011). A maioria dos casos de obesidade encontra-se associada a um quadro de resistência central à ação da leptina e da insulina. Em animais de experimentação a dieta hiperlipídica é capaz de induzir processo inflamatório no hipotálamo, que interfere com as vias intracelulares de sinalização por esses hormônios, resultando em hiperfagia, diminuição do gasto energético e, por fim, obesidade (DE SOUZA et al., 2005).

O núcleo arqueado do hipotálamo é um dos principais alvos de ação da leptina no sistema nervoso central (COLL et al., 2007). Após a identificação da leptina, o conhecimento acerca dos processos fisiológicos que regulam o balanço energético sofreu rápido incremento (SANDOVAL et al., 2008). Diversos fatores circulantes, produzidos principalmente pelo tecido adiposo, trato gastrointestinal e pâncreas, além dos próprios nutrientes, foram identificados como fatores moduladores do comportamento alimentar, tendo ação sobre hipotálamo e em outras áreas do SNC (BOURET et al., 2004).

Dentre as moléculas hipotalâmicas que participam da regulação do comportamento alimentar, figura o neuropeptídeo Y (NPY). É um dos mais abundantes peptídeos conhecidos no sistema nervoso dos mamíferos, sendo expresso em concentrações elevadas em determinadas regiões do SNC, incluindo o hipotálamo (BALASUBRAMANIAM, 2002). Os neurônios secretores de NPY, em roedores, estão especialmente localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) (TSUNEKAWA et al., 2017). Esses neurônios enviam projeções para outros núcleos da formação hipotalâmica, particularmente os núcleos paraventricular (PV) e dorsomedial (DMH), bem como área hipotalâmica lateral (LHA), criando um circuito (SÁNCHEZ, 2005). O NPY representa um potente modulador central do apetite, por atuar em neurônios orexígenos do ARC, estimulando a ingestão alimentar (SINGH et al., 2016).

Quadros metabólicos de obesidade podem ser induzidos experimentalmente em roedores, por lesão bilateral no núcleo ventromedial (VMH), e adiposidade por lesão no núcleo arqueado (ARC) induzida emprego de glutamato monossódico (GMS) (BALBO et al., 2000; ZELEZNÁ et al., 2009). O ARC é conhecido como local de secreção de neurotransmissores, peptídeos e hormônios. Por caracterizar órgão regulador de funções básicas para sobrevivência, compreende uma área cerebral de maturação precoce. A lesão nesta região na fase neonatal implica importantes efeitos na função neuroendócrina. Foi com base nessa premissa que a administração neonatal do GMS foi estabelecida como modelo de obesidade de grande relevância, empregando como instrumento de investigação do envolvimento do ARC na função neuroendócrina (JIN et al., 2015; CAO et al., 2016).

Núcleos situados no hipotálamo integram uma série de sinais com o sistema nervoso central controlando a ingestão alimentar e o gasto energético (BOURET, 2004). As vias de maior compreensão, envolvem os neurônios orexígenos NPY/AgRP e os neurônios anorexígenos POMC/CART no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo. Esses neurônios se projetam do ARC para outros importantes núcleos hipotalâmicos: paraventricular (PV), dorsomedial (DMH), ventromedial e lateral (LHA). Além disso, existem várias projeções que chegam ou partem para o tronco cerebral, das áreas corticais e das vias de retroalimentação que modulam o consumo alimentar (BOURET, 2009; BRETON, 2013).

1.3 MODELOS ANIMAS PARA O ESTUDO DA OBESIDADE

Na literatura são encontrados vários estudos de obesidade com modelo experimental animal. A obesidade em animal pode ser induzida por dieta hiperlipídica (TIAN et al., 2017), lesões física no núcleo ventromedial (VMH) do hipotálamo (HETHERINGTON & RANSON, 1940; KING, 2006), lesões químicas induzidas pela neurotoxicidade do glutamato monossódico (GMS) que se concentram no núcleo ventromedial (VMH) nos casos de obesidade e no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), nos casos de adiposidade (BALBO et al., 2000; ZELEZNÁ et al., 2009; JIN et al., 2015; CASTAÑEDA et al., 2016), e pela superalimentação durante a lactação por redução do número de filhotes da ninhada (PLAGEMANN, 2005; FISCHER et al., 2015).

1.3.1 O modelo da programação metabólica por redução de ninhada

Para investigar a relação entre a origem das alterações metabólicas e das comorbidades associadas à obesidade infantil e adulta, diversos modelos de obesidade em animais são utilizados. Dentre esses, se destacam os que procuram reproduzir condições ambientais as quais humanos podem ser expostos, para então investigar de que forma fatores como excessivo aporte energético, sedentarismo, estresse, entre outros, podem contribuir na gênese da obesidade (RODRIGUES et al., 2009; THOLE et al., 2012). Neste sentido, destaca-se o modelo de obesidade por programação metabólica, proposto por Kennedy em 1957, este modelo consiste em proporcionar maior aporte de leite à prole pela redução do tamanho da ninhada (KENNEDY, 1957).

Estudos desenvolvidos por GRINO (2005) mostraram que a superalimentação no período pós-natal imediato acelera a maturação do eixo HPA e resulta em uma condição de excesso de peso moderado na fase adulta. Adicionalmente, é sabido que a superalimentação durante o período de lactação em ratos resulta no aumento de peso corporal e modificação do crescimento durante toda a vida pós-natal (PLAGEMANN, 2006; GUILLOTEAU et al. 2009, PATEL & SRINIVASAN, 2011).

O desenvolvimento cerebral é um processo complexo e interativo, onde vários processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos figuram e interagem para a perfeita formação do encéfalo. Durante este período significativas alterações morfológicas ocorrem no encéfalo em maturação. É durante estas etapas que os neurônios estabelecem e fortalecem conexões, desenvolvem axônios e aumentam o número de contatos sinápticos (RAKIC et al., 2009). A programação metabólica ocorre em períodos críticos no desenvolvimento do organismo, dentre os quais se destacam o período gestacional, fase de amamentação e toda a primeira infância. Tais períodos são caracterizados pela maior proliferação, diferenciação, crescimento e alta plasticidade celular, em especial para o SNC (WATERLAND & GARZA, 1999; GUILLOTEAU et al., 2009).

O modelo de redução de ninhada logo após o nascimento dos filhotes tem sido amplamente usado como modelo de supernutrição pós-natal para estudos sobre obesidade e as comorbidades a ela relacionadas. O ambiente perinatal é importante para determinar o ganho de peso no futuro, adiposidade e outras propriedades fisiológicas (THOLE et al., 2012). Em resumo, as dietas ricas em gorduras e a obesidade materna durante a gestação e posteriormente durante a lactação, podem promover a obesidade e a síndrome metabólica em filhotes de ratos (LEVIN, 2006). Animais de ninhadas reduzidas apresentam excesso de peso, resistência à insulina, hiperinsulinemia e dislipidemias caracterizando a instauração da síndrome metabólica (PLAGEMANN et al., 1992).

O aumento do aporte energético durante a lactação em animais de ninhada reduzida é capaz de promover a redução da divisão simpática do sistema nervoso autônomo, redução da termogênese pelo tecido adiposo marrom, aumento do estresse oxidativo em músculo cardíaco, além de redução da secreção de insulina frente ao estímulo da glicose (HABBOU et al., 2013).

1.4 OBESIDADE E DIETAS OCIDENTAIS

São inúmeras as razões que determinam a escolha de um alimento, como fatores culturais por exemplo. Muitas vezes a falta de tempo associada à praticidade e uma escolha rápida que agrada o paladar e leva a sensação de prazer, pode se tornar um hábito alimentar, trazendo consigo o risco de obesidade (BERTHOUD, 2006). Desde a revolução industrial, a indústria alimentícia vem contribuindo drasticamente para o estabelecimento de hábitos alimentares inadequados e irradiando o ganho excessivo de calorias, estabelecendo assim o início do sobrepeso (WISSE et al., 2007). Considerando aspectos sociais envolvidos com alimentação, tais problemas na população adulta, são transmitidos à população infante-juvenil, afetando ciclos geracionais (LOBSTEIN et al., 2004).

É crescente o aparecimento de alterações metabólicas e endócrinas precedentes a instalação da obesidade na porção mais jovem da população (LOBSTEIN et al., 2004). O modo em que vivemos atualmente com a oferta de alimentos prontamente disponíveis, pouco esforço de trabalho físico e grandes tecnologias, pode causar ainda na infância de um indivíduo desordens metabólicas, e se não tratadas, podem estabelecer na vida adulta um quadro de obesidade. Toda essa oferta e exposição a estímulos ainda na infância provoca condicionamento de ingestão de alimentos na ausência de necessidade metabólica durante período crítico do desenvolvimento, quando muitas mudanças fisiológicas estão em transição facilitando a instalação de desordens metabólicas (PLAGEMANN, 2005; BERTHOUD, 2012).

Sabe-se que o período de amamentação é de extrema importância para a saúde e desenvolvimento do recém-nascido (LIBUDA et al., 2014, LECHNER & VOHR, 2017). O leite possui todos os nutrientes necessários, proteínas, vitaminas, sais minerais, lipídios, água, além de anticorpos que o protegem contra doenças (ALSAWEED et al., 2015; HASCHKE et al., 2016; LEWIS et al., 2017). A troca do leite materno por leite industrializado e altamente calórico é o gatilho para desencadear processos que provocarão desequilíbrio na estruturação dos tecidos em formação (INNIS, 2003; INNIS, 2004; LOUGHRILL & ZAND, 2016). Uma dieta é muito mais que o comer biológico, é a escolha do amanhã para o indivíduo. Dietas ricas em gorduras saturadas associadas ao

estilo de vida atual propagam uma epidemia mundial de obesidade (WISSE et al., 2007).

Os modelos utilizados atualmente para compreensão do estabelecimento do quadro de obesidade e suas comorbidades, preconizam mimetizar as condições ambientais como sedentarismo ou o aumento do aporte energético, provocando ganho de peso e alterações séricas relacionadas ao metabolismo de lipídios. Dentre estes modelos, destaca-se o modelo de programação metabólica por redução de ninhada, onde o aumento do aporte energético pela redução das ninhadas promove alterações metabólicas pré-dispondo o organismo ao desenvolvimento de comorbidades na vida adulta, entre elas a obesidade (THOLE et al., 2012), dislipidemias e resistência à insulina (BOULLU-CIOCCA et al., 2008).

1.5 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

Com a industrialização dos alimentos, o consumo de gorduras saturadas ou do tipo trans é elevado e coincidentemente a prevalência de diversas condições humanas tornou-se significativamente maior, sugerindo que os lipídios contidos na dieta podem ser fator determinante para o desenvolvimento de diversas patologias (YOUNDIM et al., 2000; BAGGIO & BRAGAGNOLO, 2006). Desta forma, os lipídios da dieta ganharam especial atenção nas últimas décadas, pois representam importante ferramenta no controle de patologias associadas aos hábitos alimentares modernos (PHILLIPS, 2013). Neste sentido, especial atenção tem sido dada aos ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPIs n-3), devido à habilidade de modular eventos biológicos tais como fluidez de membrana, transdução de sinal e expressão gênica. O número de estudos investigando o potencial nutracêutico dos AGPIs n-3 e sua aplicação clínica para o tratamento de diversas condições humanas têm aumentado de forma exponencial, e com eles o entendimento dos mecanismos de ação dos AGPIs n-3 (BORSONELO & GALDURÓZ, 2008; LI, 2015).

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e estão envolvidos em vários processos biológicos, tais como: interação com enzimas, comunicação celular, participação na constituição de alguns hormônios e atuar em cascatas bioquímicas, produzindo relações específicas para ocorrência de processos fisiológicos (BROADHURST et al., 2002; FAROOQUI et al., 2006).

Há duas importantes famílias de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs): a conhecida como n-6 ou ômega-6 e a n-3 ou ômega-3 (CURI, 2002). Todos os membros da família n-6 contêm sua primeira ligação entre o sexto e sétimo átomo de carbono a partir do terminal metila do átomo de carbono, portanto a denominação ômega-6 ou n-6. Similarmente, os ácidos graxos n-3 tem sua primeira dupla ligação entre o terceiro e quarto átomo de carbono a partir do terminal metila do átomo de carbono, portanto a denominação ômega-3 ou n-3. A família n-6 é derivada do ácido linoleico (LA), o qual tem duas duplas ligações em sua cadeia de 18 carbonos e a família n-3 é derivada do ácido α -linolênico (ALA), o qual similarmente apresenta cadeias carbônica com 18 átomos, mas contem três duplas ligações. Estas duas famílias não podem ser interconvertidas, de maneira que competem ente si pela mesma cascata enzimática de alongação e dessaturação das cadeias carbônicas (INNIS, 2007; LEHNINGER et al, 2014).

Estes ácidos graxos precursores das famílias são classificados como essenciais porque os mamíferos não são capazes de sintetizá-los, conseqüentemente, devem ser fornecidos pela dieta (INNIS, 2003). Dois distintos papéis são responsáveis pela essencialidade dos ácidos linoleico e α -linolênico: suas funções como componentes estruturais de membranas e seus papéis como precursores de substâncias fisiologicamente ativas, os eicosanoides. Os eicosanoides são sintetizados a partir de AGPIs de cadeias carbônicas contendo 20 carbonos (*gr. eicosa*: vinte), presente nos fosfolipídios nas membranas celulares. Dentre os principais substratos para produção destas moléculas bioativas em cada família estão: o ácido araquidônico (20:4; n-6) e o ácido eicosapentaenoico (20:5; n-3) (SIMOPOULOS, 2002; BORSONELO & GALDURÓZ, 2008).

Interessantemente, os derivados da família n-3 têm menor potência inflamatória do que aqueles da família n-6. Este fato levou ao interesse em se investigar qual o papel do óleo de peixe, rico em ácido graxo de cadeia longa da série n-3, no tratamento de condições inflamatórias ou ainda em outras patologias (VOLKER & GARG, 1997; ARONSON et al. 2001; YOUNG & MARTIN, 2003; CALDER & YAQOOB, 2009)

Em humanos, os ácidos linoleicos (n-6) e α -linolênico (n-3) são necessários para as membranas celulares, funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos (INNIS, 2008). Os ácidos graxos poliinsaturados da série ômega 3 são importantes no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central. Por ação de enzimas fosfolipases, os AGPIs esterificados em fosfolipídios de membrana podem ser mobilizados das membranas, atuando em processos de transdução de sinal em neurônios e outros tipos celulares. Assim, os AGPIs têm sido relacionados com ativação e modulação de cascatas bioquímicas, regulação de enzimas e canais iônicos, sugerindo que tais moléculas podem estar envolvidas com a regulação de eventos determinantes da formação do sistema nervoso central (FAROOQUI & HORROCKS 2006).

Os lipídios dietéticos, além de fornecer energia para as células, constituem a maior reserva energética corporal para crianças e recém-nascidos. Eles são componentes estruturais de todos os tecidos e são indispensáveis para a síntese das membranas celulares (FAROOQUI et al., 2000; BROADHURST et al., 2002). Nos últimos anos, despertou-se o interesse pela qualidade dos lipídios fornecidos na alimentação infantil, uma vez que já se sabe que esse é um fator determinante no crescimento, no desenvolvimento visual e neural, e na manutenção da saúde. Assim, considera-se hoje que a seleção de lipídio dietético durante a infância tem grande importância para o crescimento e o desenvolvimento (LIBUDA et al., 2014; COLLINS et al., 2015).

1.6 ÁCIDOS GRAXOS E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O cérebro de mamíferos caracteriza-se por apresentar altas concentrações de lipídios, encontrados na forma de fosfolipídios de membranas (BROADHURST et al., 2002). As membranas das células neurais de mamíferos caracterizam-se por apresentarem constituição lipídica única, contendo grandes concentrações de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs), em especial o ácido docosahexaenóico (DHA n-3), o ácido eicosapentaenóico (EPA n-3) e o ácido araquidônico (AA n-6) (AKBAR et al., 2005; CHEN et al., 2008). Durante o desenvolvimento e maturação do SNC, o cérebro utiliza grandes quantidades de DHA principalmente para síntese de novas membranas celulares, fazendo-se necessário uma dieta adequada em AGPIs n-3 (SCHIEFERMEIER & YAVIN, 2002; HORROCKS & FAROOQUI, 2004; INNIS, 2007). Por ação de enzimas fosfolipases, os AGPIs esterificados em fosfolipídios de membrana podem ser mobilizados das membranas, atuando em processos de transdução de sinal em neurônios e outros tipos celulares (ONG, et al., 2015).

Durante a gestação, a mãe é a única fonte de ácidos graxos para o feto. Os ácidos graxos são transferidos para o feto com eficiência via circulação placentária. O último trimestre de gestação e os primeiros dezoito meses pós-nascimento, representam um período crítico para incorporação de AGPIs nas membranas cerebrais (INNIS, 2004; CETIN & KOLETZKO, 2008). Durante o último trimestre de gestação, o desenvolvimento cerebral do feto exige grandes quantidades de AGPIs disponíveis para perfeita incorporação (BIRCH et al., 2000). Como consequência, os estoques de AGPIs das mães especialmente DHA, sofrem significativa redução e muitas vezes não são restabelecidos após o parto, mesmo depois de várias semanas (OTTO et al., 1997).

As membranas neuronais contêm fosfoglicerolipídeos ricos em AGPIs, especialmente DHA e ácido Araquidônico (AA) (FAROOQUI et al., 2000). Estes ácidos graxos poliinsaturados são capazes de promover alterações na função cerebral, porque quando incorporados à membrana dos neurônios, alteram suas características físico-químicas, podendo assim participar ativamente de processos de sinalização celular (FAROOQUI, 2009).

A deficiência de ácidos graxos essenciais pode causar neuropatologias, e está intimamente relacionada a outras doenças atuais como a depressão, além da obesidade, diabetes e outras comorbidades (ANSORGE et al., 2007; SIMOPOULOS, 2011; LI, 2015). Neste sentido a utilização de modelos animais representa uma importante ferramenta para a compreensão dos mecanismos pelos quais tais condições se estabelecem, bem como para identificação de possíveis estratégias de tratamento (DAI et al., 2016).

Embora vários trabalhos sobre obesidade e disfunção hipotalâmica utilizando modelos animais sejam encontrados na literatura, ainda há carência de informações sobre esse sistema de controle neuroendócrino e o papel dos ácidos graxos poliinsaturados neste cenário da obesidade. A população obesa ou com sobrepeso, vem crescendo mundialmente, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias que permitam reduzir o ganho de peso, ou minimizar as comorbidades associadas a esta patologia. Neste sentido, destaca-se o modelo de obesidade por programação metabólica, protocolo que permite o estabelecimento do quadro de obesidade em um cenário livre da interferência de fármacos (PLAGEMANN, 1999).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a instalação do quadro de obesidade e possíveis alterações morfológicas no hipotálamo de ratos Wistar submetidos ao protocolo da programação metabólica por redução de ninhada. Para alcançar estes objetivos serão avaliados os seguintes parâmetros.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliação da evolução da massa corporal e do índice de obesidade em ratos pelo calculo do Índice de Lee (IL);
- II. Composição das proteínas totais do leite pelo método de Bradford;
- III. Composição do perfil lipídico do leite por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- IV. Avaliação do consumo alimentar;
- V. Avaliação do peso das gorduras viscerais: mesentérica, retroperitoneal e perigonadal;
- VI. Avaliação dos parâmetros séricos em jejum: Triglicérides, glicemia e colesterol total por kit enzimático;
- VII. Composição do perfil lipídico do plasma em jejum através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- VIII. Quantificação neuronal dos núcleos hipotalâmicos: arqueado, área hipotalâmica lateral e paraventricular utilizando-se de técnicas de microscopia de luz e análise estereológica;
- IX. Determinação do perfil lipídico do córtex cerebral por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, conforme certificado nº 951 (ANEXO 1).

3.2 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Para obtenção dos animais foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus), obtidos a partir do acasalamento de fêmeas nulíparas (90 dias) com machos adultos (90 dias). O acasalamento foi desenvolvido pela acomodação dos animais na proporção de 3 fêmeas para 1 macho, e mantidos juntos por cerca de 14 dias. Após a confirmação da prenhez as fêmeas foram separadas em caixas individuais. Para estabelecimento dos grupos experimentais, foram selecionadas apenas as ninhadas com 9 a 12 filhotes, buscando evitar discrepâncias no peso inicial, devido a variações no tamanho dos indivíduos.

Os animais foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob condições controlada de luminosidade (ciclos invertidos 12 h claro-escuro), temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e livre acesso à água e ração até a idade de 60 dias quando foram ortotansados e coletados as amostras.

3.3 INDUÇÃO DA OBESIDADE POR REDUÇÃO DE NINHADA

A obesidade foi induzida pelo método de redução de ninhada (PLAGEMANN et al., 1999). Após o nascimento dos filhotes, todas as ninhadas tiveram seu número de filhotes ajustado para 10 indivíduos, machos ou fêmeas, sempre priorizando a escolha de filhotes machos. No terceiro dia pós-natal, foi procedido um segundo ajuste de filhotes, onde as ninhadas controle foram mantidas com 10 filhotes até o desmame e as ninhadas experimentais foram reduzidas à apenas 3 filhotes por ninhada até o desmame (Figura 2). O desmame ocorreu no 21º dia pós-natal.

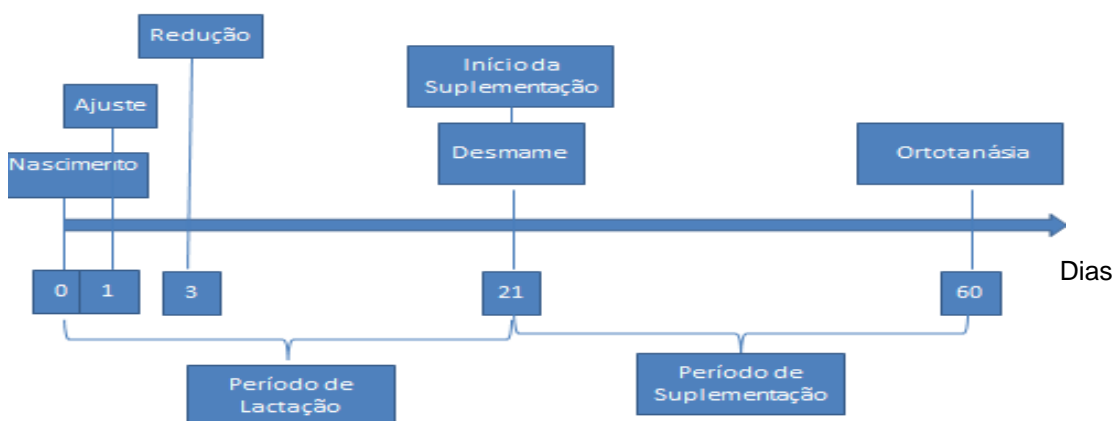


FIGURA 1 - DESENHO EXPERIMENTAL EM DIAS. FONTE: DO AUTOR.

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais conforme descrito a seguir:

- I. Grupo Controle (CON): Constituído por animais obtidos das proles que permaneceram com 10 filhotes por ninhada e alimentados com ração para ratos (Nuvilab CR1 – Nuvital nutrientes S/A).
- II. Grupo Controle Suplementado (CONS): Constituído por animais obtidos das proles que permaneceram com 10 filhotes por ninhada e alimentados com ração para ratos (Nuvilab CR1 – Nuvital nutrientes S/A) e suplementados com 1g/kg/dia de óleo de peixe.
- III. Grupo Obeso (OB): Constituído por animais de ninhadas reduzidas a 3 animais por ninhada e alimentados com ração para ratos (Nuvilab CR1 – Nuvital nutrientes S/A).
- IV. Grupo Obeso Suplementado (OBS): Constituído por animais de ninhadas reduzidas a 3 animais por ninhada e alimentados com ração para ratos (Nuvilab CR1 – Nuvital nutrientes S/A) e suplementados com 1g/kg/dia de óleo de peixe.

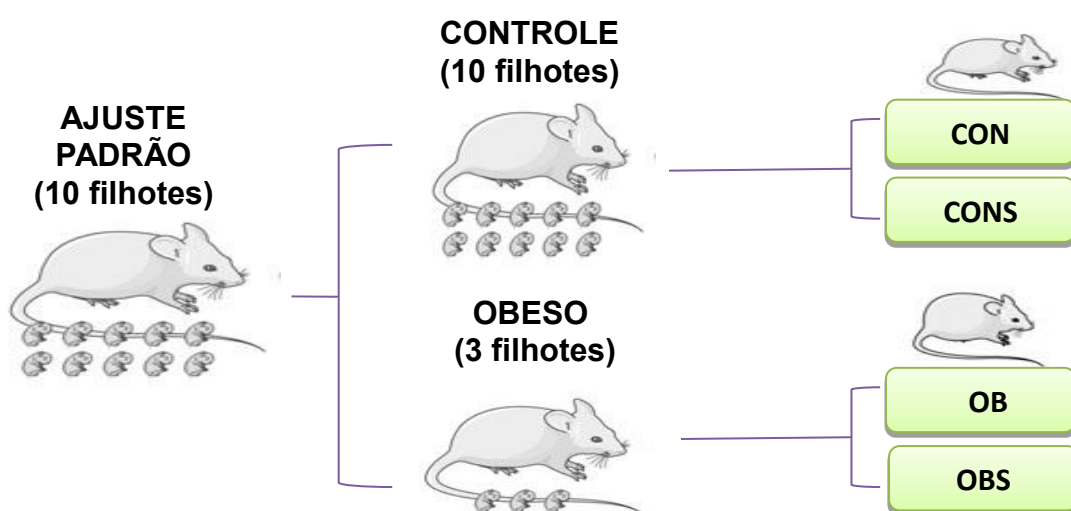


FIGURA 2 - ILUSTRAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS: CONTROLE (CON), CONTROLE SUPLEMENTADO (CONS), OBESO (OB) E OBESO SUPLEMENTADO (OBS). FONTE: HABBOUT et al., 2013 – ADAPTADO.

3.5 ORDENHA DO LEITE

Após o término do período de lactação, durante a manhã do dia do desmame as ratas progenitoras foram separadas de suas ninhadas. Desta forma, em um intervalo de no mínimo 4 horas depois, um novo leite encontrava-se disponível para a ordenha nas glândulas mamárias. Para isso, as ratas foram anestesiadas intramuscularmente pela injeção de xilasina (0,2 mg/g) e quetamina (0,5 mg/g). Para facilitar a ordenha do leite também foi administrada uma dose intraperitoneal de 5 µl/kg de peso da rata de ocitocina sintética (Forte UCB - 10µl/1ml) para estimular a liberação do leite. Em seguida do efeito da ocitocina foi iniciada ordenha manual para coleta do leite. Todas as amostras de leite foram coletadas em microtubos e congeladas a -20° C.

3.6 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DO LEITE

Para quantificar as proteínas totais presentes no leite foi realizada a análise pelo método de Bradford (1976), em duplicata. Nesta técnica utilizou-se o corante de *Coomassie brilliant blue*. E para leitura dos dados foi utilizado o leitor de Elisa, Biotek ELX 800, em absorbância de 595 nm.

3.7 SUPLEMENTAÇÃO

A suplementação oral foi realizada diariamente com 1g/kg/dia de óleo de peixe, com o auxílio de uma pipeta de volume ajustável. Os animais foram suplementados desde o desmame, 21 dias, até a idade de 60 dias, quando foram ortotanasiados e obtidas às amostras experimentais. As cápsulas de óleo de peixe que foram gentilmente doadas pela Naturalis Nutrição & Farma Ltda, e continham cada uma, 180 mg de EPA, 120 mg de DHA.

3.8 EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL

A evolução da massa corporal durante o período de lactação foi avaliada semanalmente com 7, 14 e 21 dias de idade dos filhotes. Após o desmame a massa corporal foi avaliada semanalmente, três vezes por semana em balança digital (GEHAKA, 350), até a idade de 60 dias.

3.9 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO

O consumo de ração foi avaliado três vezes por semana, dos 22 aos 60 dias de idade, baseado pela subtração entre a ração ofertada e sua sobra por caixa. Os dados foram expressos como g/100 g de peso corporal.

3.10 AVALIAÇÃO DA OBESIDADE

3.10.1 Índice de Lee (IL)

A obesidade foi avaliada pelo cálculo do Índice de Lee, aos 21 e aos 60 dias de idade. O índice de Lee é calculado a partir da relação entre massa corporal e comprimento naso-anal (CNA) (BERNARDIS & PATTERSON, 1968) pelo emprego da fórmula:

$$IL = \sqrt[3]{\text{massa corporal}/\text{CNA}}.$$

3.10.2 Peso das gorduras abdominais viscerais

A instalação do quadro obeso também foi avaliado pela dissecação seguida da pesagem das gorduras viscerais (mesentérica, retroperitoneal e perigonadal) da cavidade abdominal, expressos em g/100 g do peso corporal.

3.11 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO PLASMA

Após a decapitação dos animais em jejum de 12 horas, o sangue total foi coletado em tubos falcon heparinizados, sendo em seguida centrifugados em 3000 rpm durante 7 minutos para a separação do plasma. Em sequência foi coletado o plasma e armazenado em microtubos e congelados à -20°C. As amostras foram submetidas às análises de glicose, triglicérides e colesterol totais, por método enzimático usando Kit comercial (Vida biotecnologia). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Infinite® 200 Pro series TECAN) a 500 nm, e os resultados foram expressos em mg/dL.

3.12 PERFIL LIPÍDICO E CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA

O perfil lipídico do tecido cerebral (0,015 g), plasma (100 µl) e leite (50 µl) dos animais, foi determinado por cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatography- HPLC).

Extração dos lipídeos das amostras foi efetuada de acordo com o método descrito por Folch et al., 1957. Os tecidos cerebrais, plasma e as amostras de leite das progenitoras foram homogeneizados em 1,33 ml de clorofórmio: metanol (2:1 v/v). Ao sobrenadante resultante da homogeneização adicionou-se 0,24 ml de metanol para precipitação de proteínas. As amostras depois de homogeneizadas, foram centrifugadas durante 10 minutos a 2500 rpm em centrífuga Eppendorf modelo 5810R. A fase superior (hidrometanólica) foi transferida para outro tubo de ensaio e adicionou-se 0,48 ml de cloroformio e 0,41 ml de água, para formação de emulsão. Após a formação espontânea de sistema bifásico, cada amostra foi adicionado 1 ml da solução de Folch (clorofórmio:metanol:água, 3:48:47 v/v) para eluição da fração hidrometanólica. Os extratos lipídicos foram submetidos à secagem em fluxo de nitrogênio gasoso, em banho-maria a 37° C.

Após secagem, as amostras contendo os lipídios foram saponificadas, processo onde separou-se apenas os ácidos graxos dos lipídeos totais. À cada amostra submetida ao fluxo de nitrogênio, foram acrescentados 0,1 ml de

metanol e saponificadas com 2 ml de solução alcalina em metanol (1 mol/L de hidróxido de sódio em metanol a 90 %) sendo então incubadas em banho-maria a 37° C, sob agitação por 2 horas (NISHIYAMA-NARUKE et al., 1998). Após incubação as amostras foram resfriadas em banho de gelo e a solução alcalina foi acidificada até atingir pH 3.0 pela adição de ácido clorídrico 1 mol/L. Os ácidos graxos contidos nesta solução foram extraídos pela adição 1 ml de hexano, em três repetições. A fração obtida das extrações foi evaporadas em fluxo de nitrogênio gasoso. Após secagem, amostras foram acondicionadas à -20° C, protegidas da luz, até a derivatização e posterior análise por HPLC. Para detecção em cromatógrafo líquido alta precisão (HPLC), os ácidos graxos foram ressuspensos em acetonitrila e derivatizados usando Brometil-Metóxi-Coumarin (BMMC) (1 mg/ml), a 60° C por 15 minutos (ABUSHUFA et al., 1994). Após a incubação, estas foram diluídas em igual volume de acetonitrila e transferidas para *vials* de injeção, onde foram mantidas a 10° C até o momento da injeção no HPLC.

Para a análise dos ácidos graxos derivatizados através do detector de fluorescência, foram realizadas injeções no volume de 100 µl de cada amostra. Os ácidos graxos foram injetados em cromatógrafo líquido Varian Pró-Star e separados em coluna de sílica C8, com partícula interna de 5 µm de poro de saída de 100 Å. A eluição aconteceu pela injeção de fase móvel, em gradiente isocrático de acetonitrila e água (77/23 - v/v). Uma vez eluídos, os ácidos graxos foram detectados através de detector de fluorescência, com excitação em 325 nm e excitação 398 nm.

A incorporação lipídica foi estimada através da diferença entre os percentuais de cada ácido graxo, quando comparados com o percentual no grupo controle.

3.13 MICROSCOPIA DE LUZ

Para obtenção das amostras para microscopia de luz, os animais foram profundamente anestesiados pelo uso de tiopental (200mg/kg, i.p.) e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina 0,9 %, seguida de paraformaldeído (PFA) a 4 %, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Os encéfalos foram pós-fixados em alfac por 24 horas, em seguida foram transferidos para solução de álcool 70 %. A desidratação das amostras ocorreu em série crescente de álcool, diafanizados em xilol e emblocados em parafina. Para correta localização da região do hipotálamo e os respectivos núcleos hipotalâmicos (Figura 3), foi utilizado o atlas The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (PAXINOS, G. & WATSON, C., 2004). Os cortes histológicos foram obtidos com espessura de 7 µm por meio de um micrótomo E. LEITZ GMBH^R. A cada corte coletado o próximo era descartado. Em seguida, as lâminas histológicas foram montadas com auxílio de uma placa aquecedora Quimis, modelo Q.31.3.21.

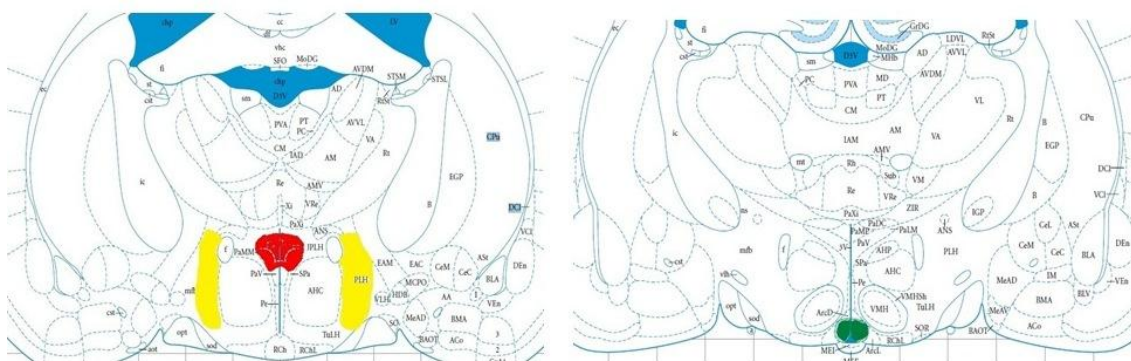


FIGURA 3 - ANATOMIA DA FORMAÇÃO HIPOTALÂMICA E SEUS NÚCLEOS: LHA (AMARELO), PV (VERMELHO) E ARC (VERDE). FONTE: ATLAS THE RAT BRAIN IN STEREOTAXIC COORDINATES (PAXINOS, G. & WATSON, C., 2004).

3.14 COLORAÇÃO DE NISSL

A coloração em cresil violeta (0,5 % em 3 % de ácido acético) ocorreu a 37 °C por tempo suficiente para evidenciar os corpos celulares e a evidenciação da coloração ocorreu pela incubação em etanol-ácido acético (95 % -5 % v/v) até que a intensidade de coloração desejada fosse alcançada. As

lâminas foram desidratadas em séries crescentes de álcool, incubadas em xilol e montadas em Entellan®.

3.15 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

Para a contagem estereológica dos corpos celulares dos neurônios dos núcleos hipotalâmicos arqueado, paraventricular e área hipotalâmica lateral, foi utilizado o princípio do dissector físico (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Este sistema impõe a aplicação de uma moldura formada por uma linha proibida (linha contínua) e por uma linha permitida (linha pontilhada). Foram contados apenas os corpos celulares dos neurônios do plano superior que se encontravam dentro da moldura ou tocando a sua linha permitida, desde que não passasse pela linha proibida.

Foram determinados os seguintes parâmetros estereológicos dos corpos celulares dos neurônios dos núcleos hipotalâmicos: Densidade por Área (Na) e Densidade Numérica (Nv). Todas as lâminas preparadas com a técnica histoquímica Nissl foram foto documentadas por meio do scanner de lâminas. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio Axiolmager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com software de captura automatizada Metafer 4/VSlide (Metasystems, Altussheim, DE). Todas as imagens foram analisadas por meio do Programa VSViewer com aumento de 80 vezes. Com o auxílio do software de desenho AutoCAD versão 2014 da Autodesk inseriram-se as imagens e desenhou-se sobre as mesmas o dissector físico de $40000 \mu\text{m}^2$ ($200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$) e na sequência foi desenhado e aplicado um marcador circular para quantificar o número de neurônios (Figura 4). Assim foi aplicado para cada núcleo hipotalâmico estudado, em ambos os lados direito e esquerdo e em cada corte histológico analisado para então a partir deste se obter a análise dos parâmetros estereológicos, a Densidade por área (Na) e Densidade Numérica (Nv) dos corpos celulares dos neurônios.

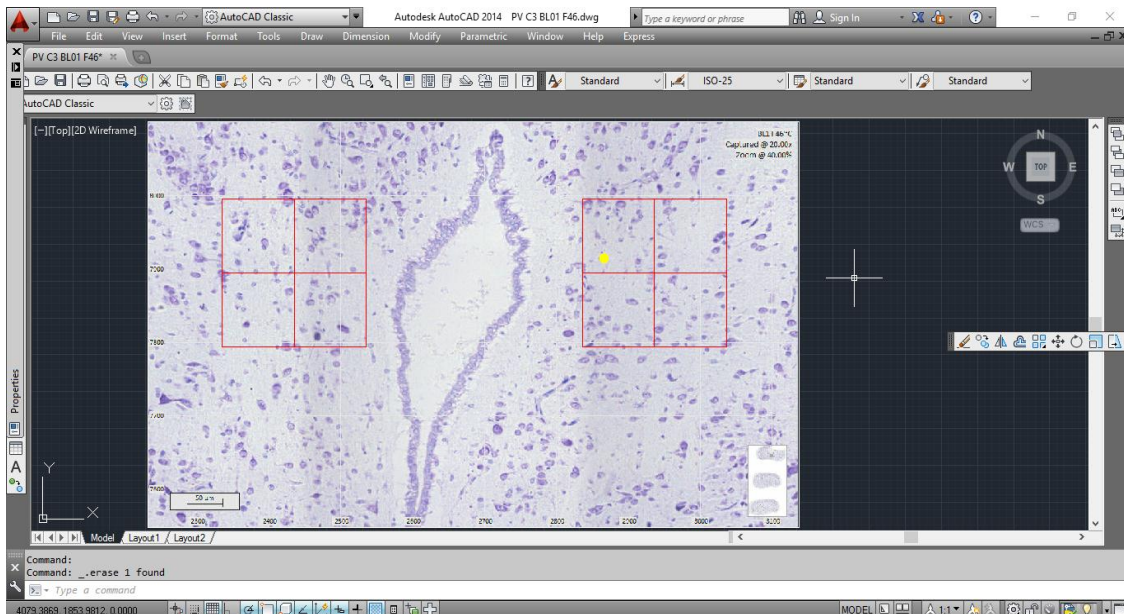


FIGURA 4 - IMAGEM HISTOLÓGICA DO NÚCLEO PV COM O DISSECTOR FÍSICO (VERMELHO) E O MARCADOR (AMARELO). AMBOS INSERIDOS PELO SOFTWARE DE DESENHO AUTOCAD. FONTE: DO AUTOR.

Para obtenção dos parâmetros tridimensionais dos núcleos hipotalâmicos (arqueado, paraventricular e área hipotalâmica lateral) foram aplicadas as seguintes fórmulas:

Densidade por Área (Na)

$$Na = N / At$$

Na= Número de perfis celulares observados na área-teste
At

Densidade Numérica (Nv)

$$Nv = \Sigma Q / Vol[\text{dissector}]$$

Nv= Número total de neurônios de cada animal por núcleo
Volume [dissector]

$$\text{Volume [dissector]} = e \cdot At$$

e: Espessura do micrômetro ($7 \mu\text{m} \times 3 \text{ cortes} = 21$).

At: Área-teste do plano superior ($200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m} = 40.000$).

ΣQ : Somatória do número de perfis celulares de cada animal por núcleo.

N: Número de perfis celulares observados na área-teste do dissector.

3.16 ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média mais Erro Padrão da Média, submetidos ao teste “t” de Student ou ANOVA, conforme indicado. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$. Para composição dos gráficos e tratamento estatístico dos resultados, foi utilizado o software Prisma GraphPad versão 6.0 (Graphpad Software, San Diego, Califórnia, EUA.).

4 RESULTADOS

4.1 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL DURANTE A LACTAÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os dados apresentados foram divididos em duas fases: Período de lactação e a caracterização da programação metabólica por redução de ninhada, e na sequência, a evolução do peso corporal ao longo do experimento e efeito da suplementação sobre esta variável. Os dados foram mensurados ao longo das diferentes fases do crescimento do animal, desde 7 até 60 dias de idade.

4.1.1 Evolução do peso dos filhotes no período de lactação

O período de lactação em ratos acontece até o 21º dia de vida do filhote. Por esta razão foi mensurado a evolução do ganho da massa corporal nos períodos de 7, 14 e 21 dias de idade. A partir das mensurações no 21º dia de idade, calculou-se o IL.

Durante o período lactacional, o ganho da massa corpórea dos animais controles e obesos por redução de ninhada mostrou-se significativamente diferente desde o sétimo dia, conforme demonstra a figura 5 A. O ganho da massa corporal nos filhotes do grupo OB foi 21,09 % maior, em relação aos filhotes do grupo CON. Essa diferença persistiu e seguiu aumentando durante todo o período lactacional. As figuras 5 B e 5 C representam a evolução do peso corporal no 14º e 21º dia de lactação, com aumento de 33,23 % e 25,82 % respectivamente em relação aos animais CON. O IL das ninhadas no 21º dia de vida (desmame) é representado pela figura 5 D. Ratos OB apresentaram IL maior em 2,45 % comparados aos ratos CON ($p < 0,05$).

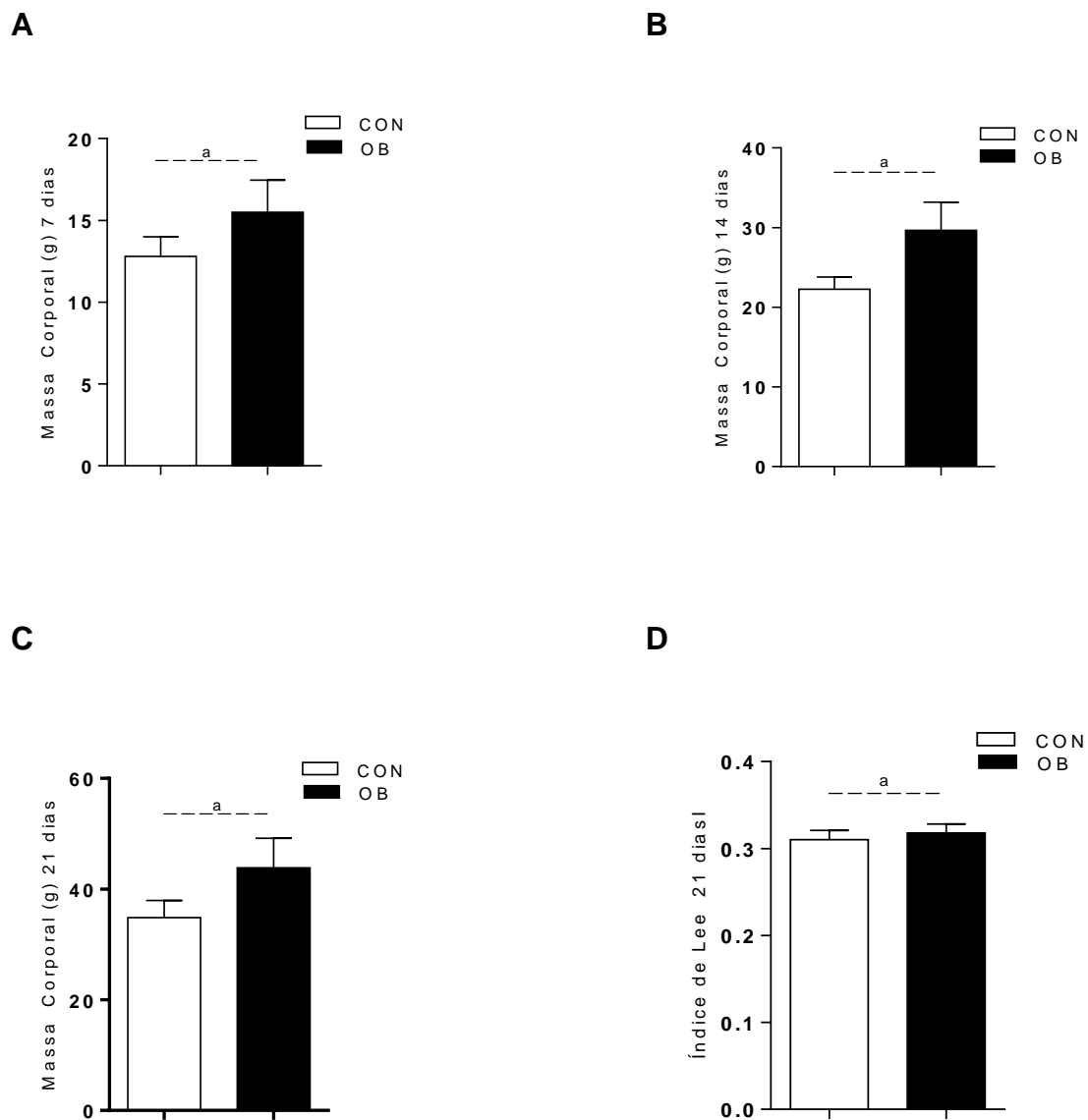


FIGURA 5 - CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE OBESIDADE DURANTE O PERÍODO LACTACIONAL. FIGURAS REPRESENTAM GANHO DE MASSA CORPORAL DA NINHADA AOS 7 DIAS (FIG. 5 A) AOS 14 DIAS (FIG. 5 B) E AOS 21 DIAS (FIG. 5 C). FIGURA 5 D REPRESENTA O IL AOS 21 DIAS. DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM (N=45-60) ^a p<0,05 vs. CON.

4.1.2 Composição do leite

Na avaliação da composição do leite, buscamos identificar alterações protéicas e lipídicas decorrentes da redução de ninhada. A figura 6 mostra a quantificação de proteínas nas amostras de leite, onde o leite de ratas progenitoras dos grupos OB apresentou aumento de 27,41 % na concentração de proteínas totais quando comparado ao leite de ratas progenitoras dos grupos CON ($p < 0,05$).

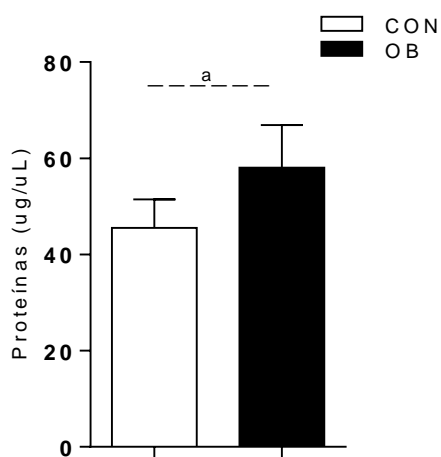


FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DO LEITE DE RATAS PROGENITORAS. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM PARA 10 ANIMAIS. ^a $p < 0,05$ vs. CON.

O perfil lipídico do leite foi determinado por HPLC e demonstrou que a redução de ninhada provocou alterações na constituição de ácidos graxos. As análises permitiram identificar aumento no percentual dos ácidos graxos: linoléico presente em concentração 17,29 % maior, oleico com o percentual de 71,40 % maior e esteárico com 94,88 % a mais no leite das ratas que alimentou o grupo obeso quando comprado ao leite do grupo controle. Os ácidos graxos mirístico e EPA tiveram redução do percentual no leite do grupo obeso, de - 36,20 % e - 64,42 % respectivamente, quando comparados ao controle. Os percentuais dos demais ácidos graxos encontrados no leite estão apresentados na tabela 1.

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DE LEITE OBTIDAS DE RATAS PROGENITORAS CONTROLE E OBESO. OS DADOS REPRESENTAM AS MÉDIAS \pm EPM.

LEITE		
ÁCIDO GRAXO	CON (n=6)	OB (n=15)
Láurico (12:0)	21,35 \pm 2,23	20,04 \pm 1,35
Linoléico (18:2 n-6)	28,05 \pm 2,23	32,90 \pm 0,87 ^a
Mirístico (14:0)	13,23 \pm 1,55	8,440 \pm 0,91 ^a
Oléico (18:1 n-9)	11,05 \pm 1,41	18,94 \pm 0,97 ^a
Palmítico (16:0)	19,38 \pm 1,98	16,68 \pm 0,57
EPA (20:5 n-3)	1,203 \pm 0,22	0,428 \pm 0,091 ^a
α -linolénico (18:3 n-3)	2,30 \pm 0,26	2,239 \pm 0,20
Araquidônico (20:4 n-6)	1,59 \pm 0,15	1,755 \pm 0,18
Esteárico (18:0)	1,348 \pm 0,27	2,627 \pm 0,26 ^a
Razão n6:n3	8,47	13,03

a: p < 0,05 quando comparado ao grupo CON.

4.2 EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL ASSOCIADA AO CONSUMO ALIMENTAR E EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO

Os dados apresentados demonstram o efeito da redução do número de filhotes por ninhada após o término do período de lactação, a partir do 22º dia de idade até os 60 dias de idade. Assegurando que os animais dos grupos OB e OBS estão metabolicamente “imprintados” quando comparados aos animais dos grupos CON e CONS. Os dados seguirão a ordem de apresentação: CON versus OB, OB versus OBS e CON versus CONS.

Conforme os dados apresentados na figura 7 A, o IL apresentou aumento de 2,59 % do grupo OB em relação ao CON. A evolução da massa corporal até os 60 dias de idade no grupo OB foi 19,07 % maior que o CON, demonstrado na figura 7 B e o consumo alimentar mensurado nos grupos CON&CONS e OB&OBS, está apresentado na figura 7 C.

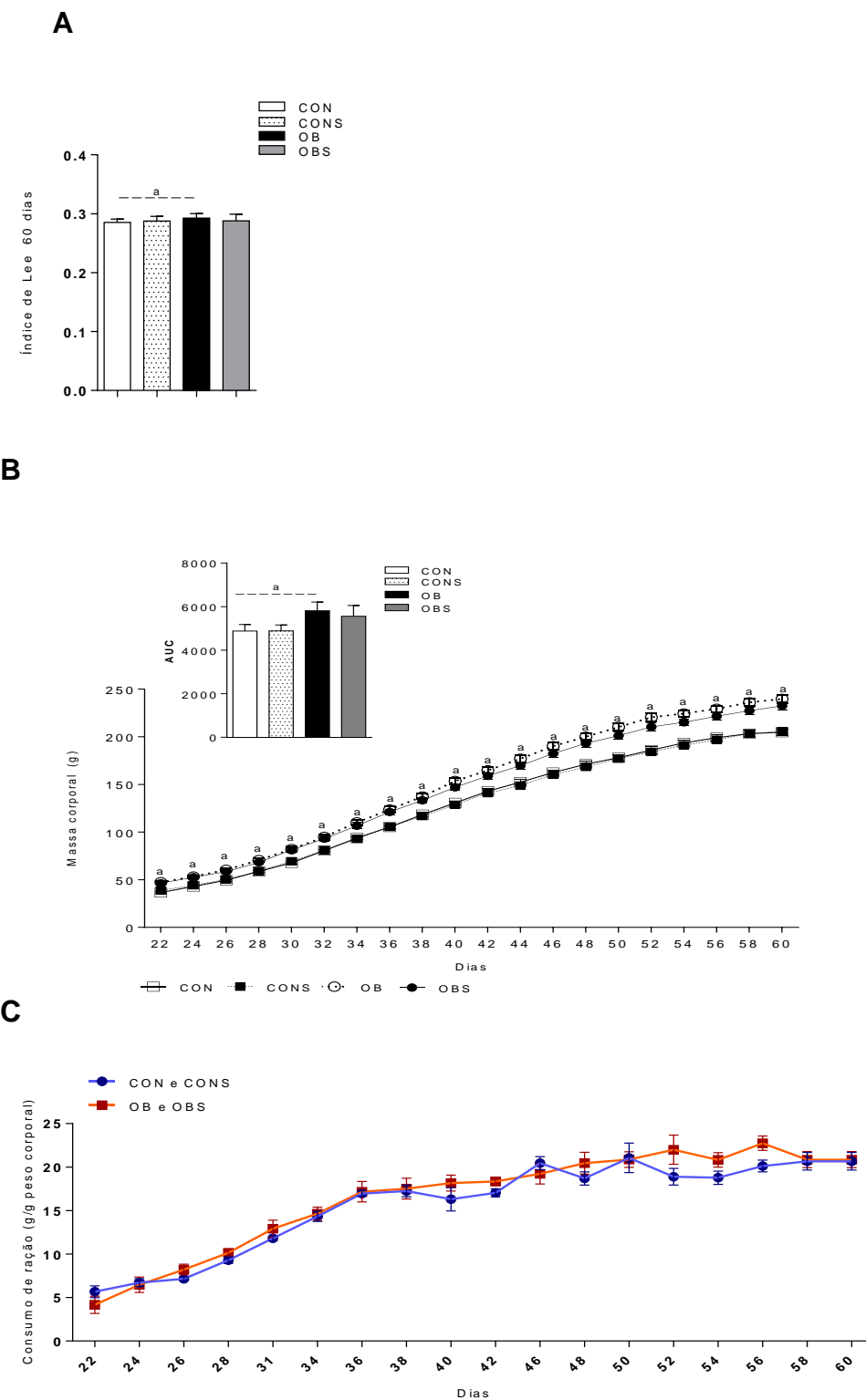


FIGURA 7 - EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL E O CONSUMO ALIMENTAR ASSOCIADO À PROGRAMAÇÃO METABÓLICA E AO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM O ÓLEO DE PEIXE. AVALIAÇÃO DO IL AOS 60 DIAS (FIG. 7 A) E EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL DOS 22 AOS 60 DIAS DE IDADE (FIG. 7 B). CONSUMO ALIMENTAR DE RAÇÃO AO LONGO DO PERÍODO EXPERIMENTAL (FIG. 7 C). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM, PARA 25 ANIMAIS. ^a $p < 0,05$ vs. CON.

4.3 ALTERAÇÕES DOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS DECORRENTES DA OBESIDADE E EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO

A instalação do quadro de obesidade, induzido por meio do modelo da programação metabólica foi observada desde o período de lactação e ao longo do crescimento do animal até os 60 dias de idade, relatados em dados anteriores. Os dados obtidos da mensuração dos panículos adiposos apontam aumento do depósito de gorduras. Também foram encontradas alterações em parâmetros biométricos dos animais de ninhada reduzida sugerindo a instalação do quadro de obesidade (Figura 8). O aumento dos depósitos de gorduras pode ser observado no tecido adiposo retroperitoneal com acúmulo 49,19 % maior no grupo OB em relação ao grupo CON. A suplementação com óleo de peixe foi capaz de reduzir em - 24,39 % o acúmulo de gordura no grupo OBS quando comparado ao grupo OB, como demonstrado na figura 8 A. Quanto ao depósito de gordura mesentérica houve aumento de 33,01 % no grupo OB em comparação ao CON e - 13,61 % no grupo OBS quando comparado ao grupo OB (figura 8 B). A gordura perigonadal, figura 8 C, apresentou um aumento de 35,50 % no grupo OB. A massa de outros órgãos também foi avaliada: a gordura marrom (figura 8 D), fígado (figura 8 E) e coração (figura 8 F), mas estes não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos.

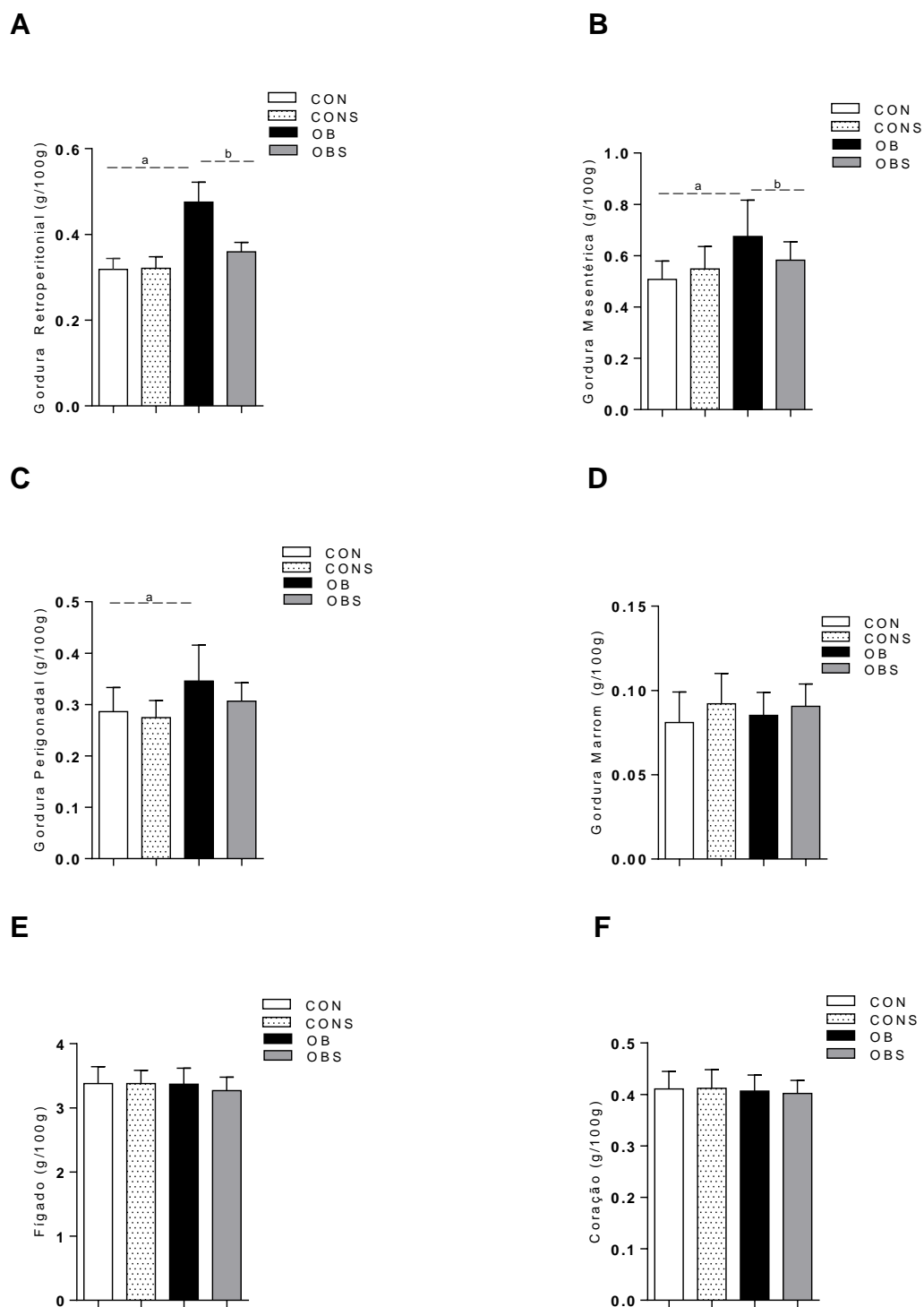


FIGURA 8 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO EM ANIMAIS OBESOS. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOMÉTRICOS AOS 60 DIAS DE: GORDURAS RETROPERITONIAL (FIG. 8 A), MESENTÉRICA (FIG. 8 B), PERIGONADAL (FIG. 8 C) E MARROM (FIG. 8 D), DO FÍGADO (FIG. 8 E) E CORAÇÃO (FIG. 8 F). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM PARA 20 ANIMAIS. ^a $p < 0,05$ vs. CON ; ^b $p < 0,05$ vs. OB.

Dentre as análises séricas, foi possível identificar que os valores basais de glicose e colesterol total não sofreram alterações nos grupos estudados, seja em função da programação metabólica ou da suplementação com óleo de peixe (figuras 9 B e 9 C).

De maneira distinta a análise de triacilgliceróis e no perfil de ácidos graxos circulantes, onde significativas alterações foram encontradas. As concentrações séricas de triacilgliceróis, após jejum de 12 horas, apresentaram aumento de 56,4 % em animais OB quando comparados aos animais CON, figura 9 A. As comparações entre os grupos OB e OBS não foram significativamente diferentes.

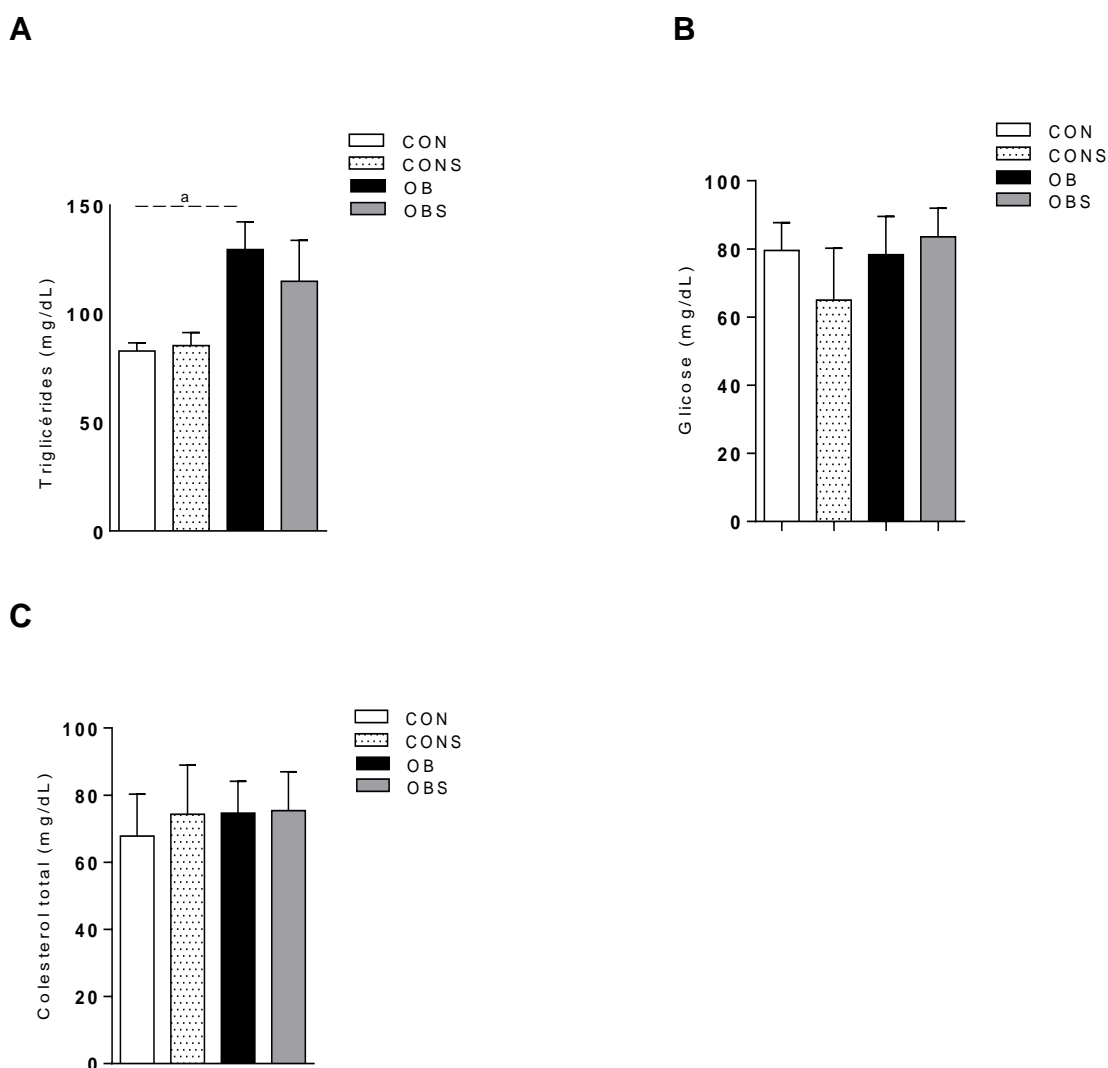


FIGURA 9 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO SOBRE PARÂMETROS SÉRICOS EM ANIMAIS OBESOS AOS 60 DIAS. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TRIGLICÉRIDES (FIG. 9 A), PERFIL GLICÊMICO (FIG. 9 B), CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE COLESTROIS TOTAIS (FIG. 9 C). OS DADOS REPRESENTAM MÉDIA \pm EPM PARA 20 ANIMAIS. ^a $p < 0,05$ vs. CON.

4.4 COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO PLASMA

A tabela 2 apresenta o perfil de ácidos graxos plasmáticos dos diferentes grupos, detectados através de HPLC. As porcentagens de DHA nas amostras de plasma do grupo CONS estavam 40,36 % maior que o CON e no grupo OBS 118,16 % maior que o grupo OB. Mas quando comparamos o grupo OB e CON, o grupo OB mostrou uma diminuição de – 28,65 % de DHA. Para as porcentagens de EPA, a suplementação no grupo CONS mostrou um aumento de 245,79 % quando comparado ao CON e o grupo OBS mostrou com a suplementação um aumento de 161,68 % de EPA quando comparado ao grupo CON (Tabela 2).

TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DE PLASMA DOS RATOS DOS GRUPOS CONTROLE, CONTROLE SUPLEMENTADO, OBESO E OBESO SUPLEMENTADO. OS DADOS SÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± EPM.

PLASMA				
ÁCIDO GRAXO	CON (n=5)	CONS (n=5)	OB (n=5)	OBS (n=5)
Araquidônico (20:4 n-6)	27,28 ± 2,13	22,59 ± 0,85	26,69 ± 1,36	25,10 ± 1,79
DHA (22:6 n-3)	2,40 ± 0,15	3,38 ± 0,48 ^a	1,71 ± 0,24 ^c	3,74 ± 0,93 ^b
Estearíco (18:0)	10,14 ± 0,47	10,44 ± 0,75	9,07 ± 0,56	9,27 ± 0,79
Láurico (12:0)	6,74 ± 0,74	5,14 ± 0,42	6,40 ± 0,86	6,22 ± 0,34
Linoléico (18:2 n-6)	24,13 ± 1,23	24,93 ± 1,85	25,14 ± 1,34	24,52 ± 1,48
Oléico (18:1 n-9)	7,21 ± 0,44	7,96 ± 0,29	8,61 ± 0,49	8,00 ± 0,39
Palmítico (16:0)	20,60 ± 1,51	22,48 ± 1,00	20,58 ± 0,88	20,85 ± 1,05
α-linolénico (18:3 n-3)	0,86 ± 0,24	0,57 ± 0,07	0,61 ± 0,10	0,45 ± 0,11
Mirístico (14:0)	0,84 ± 0,14	1,11 ± 0,14	1,24 ± 0,28	0,96 ± 0,16
EPA (20:5 n-3)	0,53 ± 0,02	1,85 ± 0,17 ^a	ND	1,40 ± 0,05 ^a
Razão n-6:n-3	13,56	8,19	22,34	8,87

a: p < 0,05 quando comparado ao Controle; b: p < 0,05 quando comparado ao grupo OB; c: p < 0,05 quando comparado ao Controle. ND: não detectado.

4.5 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HIPOTALÂMICAS

4.5.1 Análise estereológica dos núcleos hipotalâmicos: área hipotalâmica lateral, arqueado e paraventricular

As análises dos núcleos hipotalâmicos elencados como prováveis participantes das alterações metabólicas decorrentes do quadro de obesidades, encontram-se destacados na figura 10. Para avaliar eventuais efeitos da programação metabólica e da suplementação sobre estes núcleos, foi avaliada a densidade neuronal (Na) por área do dissector e a densidade neuronal numérica (Nv) no volume total do núcleo em avaliação.

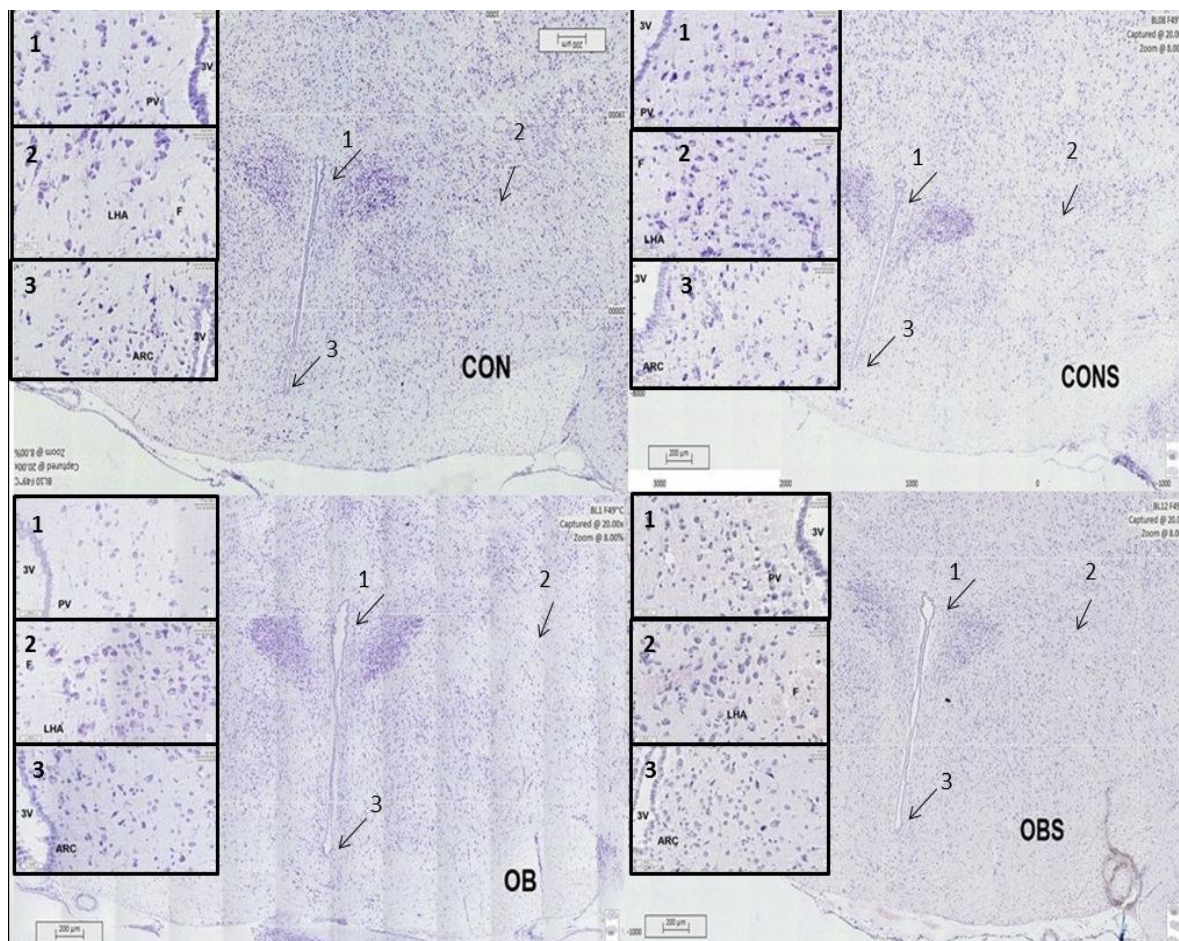


FIGURA 10 - IMAGEM HISTOLÓGICA DA ÁREA HIPOTALÂMICA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS. OS CORTES FORAM OBTIDOS A 7 μ m DE ESPESSURA E CORADOS EM CRESIL VIOLETA. AS SETAS NAS IMAGENS MOSTRAM OS NÚCLEOS 1 (PV), 2 (LHA) E 3 (ARC). A ESQUERDA ESTÁ EM DESTAQUE CADA NÚCLEO AVALIADO. AS IMAGENS FORAM CAPTADAS PELO PROGRAMA VSVIEWER.

4.5.2 Densidade por área (Na)

A densidade neuronal por área, dos núcleos elencados está apresentada na tabela 3. Apesar dos claros efeitos metabólicos decorrentes da programação metabólica, não foram identificadas alterações significativas na densidade neuronal por área em nenhum dos grupos experimentais.

TABELA 3 - DENSIDADE POR ÁREA (NA) DOS NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS DE RATOS CONTROLE, CONTROLE SUPLEMENTADO, OBESO E OBESO SUPLEMENTADO. OS DADOS REPRESENTAM AS MÉDIAS \pm EPM.

NÚCLEO	GRUPO (n=5)	Na μm^2	
		Direito	Esquerdo
LHA	CON	0,001842 \pm 5,338E-5	0,001843 \pm 0,0001229
	CONS	0,001713 \pm 0,0001098	0,001727 \pm 7,843 E-5
	OB	0,001897 \pm 0,000112	0,001858 \pm 0,0001362
	OBS	0,001793 \pm 5,496E-5	0,001765 \pm 8,649E-5
ARC	CON	0,001977 \pm 0,0001253	0,002002 \pm 0,0001481
	CONS	0,002147 \pm 0,0001341	0,002168 \pm 0,0001340
	OB	0,002303 \pm 0,0001888	0,002347 \pm 0,0001734
	OBS	0,002475 \pm 0,0001225	0,002483 \pm 0,0001499
PV	CON	0,001867 \pm 0,0001326	0,001763 \pm 0,0001267
	CONS	0,001958 \pm 9,767E-5	0,00201 \pm 0,0001533
	OB	0,001857 \pm 0,0001350	0,0018 \pm 9,313E-5
	OBS	0,002005 \pm 0,0001019	0,001893 \pm 7,506E-5

4.5.3 Densidade numérica (Nv)

De forma semelhante ao que foi identificado na avaliação da densidade por área, na densidade numérica também não foi possível identificar alterações nos grupos estudados. Os valores da análise de densidade numérica encontram-se apresentados na tabela 4.

TABELA 4 - DENSIDADE NUMÉRICA (NV) DOS NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS DE RATOS CONTROLE, CONTROLE SUPLEMENTADO, OBESO E OBESO SUPLEMENTO. OS DADOS REPRESENTAM AS MÉDIAS \pm EPM.

NÚCLEO	GRUPO (n=5)	NV μm^3	
		DIREITO	ESQUERDO
LHA	CON	0,0002631 \pm 1,157E-5	0,0002633 \pm 3,048E-5
	CONS	0,0002448 \pm 2,659E-5	0,0002467 \pm 1,578E-5
	OB	0,0002709 \pm 2,711E-5	0,0002655 \pm 3,478E-5
	OBS	0,0002562 \pm 8,348E-6	0,0002522 \pm 2,023E-5
ARC	CON	0,0002824 \pm 3,011E-5	0,0002859 \pm 3,726E-5
	CONS	0,0003067 \pm 3,264E-5	0,0003098 \pm 3,236E-5
	OB	0,0003291 \pm 4,674E-5	0,0003353 \pm 4,200E-5
	OBS	0,0003536 \pm 2,343E-5	0,0003548 \pm 3,876E-5
PV	CON	0,0002667 \pm 3,232E-5	0,0002519 \pm 3,047E-5
	CONS	0,0002798 \pm 2,400E-5	0,0002871 \pm 3,678E-5
	OB	0,0002652 \pm 3,453E-5	0,0002571 \pm 2,404E-5
	OBS	0,0002864 \pm 1,681E-5	0,0002705 \pm 1,551E-5

4.5.4 Concentração de ácidos graxos no córtex cerebral

As concentrações de ácidos graxos no córtex cerebral não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos. Os percentuais dos ácidos graxos encontrados no córtex cerebral dos ratos estão representados na tabela 6.

TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DO CÓRTEX CEREBRAL DOS RATOS DOS GRUPOS CONTROLE, CONTROLE SUPLEMENTADO, OBESO E OBESO SUPLEMENTADO. OS DADOS SÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm EPM.

CÓRTEX CEREBRAL				
ÁCIDO GRAXO	CON (n=5)	CONS (n=5)	OB (n=5)	OBS (n=5)
Araquidônico (20:4 n-6)	14,90 \pm 0,39	14,26 \pm 0,17	14,88 \pm 0,42	14,95 \pm 0,32
DHA (22:6 n-3)	21,73 \pm 0,95	22,17 \pm 1,56	22,76 \pm 1,40	22,92 \pm 1,34
Estearico (18:0)	15,33 \pm 0,62	15,64 \pm 0,36	14,87 \pm 0,51	15,92 \pm 0,77
Oléico (18:1 n-9)	19,56 \pm 1,03	18,84 \pm 1,00	19,94 \pm 0,80	19,25 \pm 0,46
Palmítico (16:0)	25,35 \pm 0,49	27,62 \pm 1,45	25,23 \pm 0,59	26,13 \pm 1,01
Linoléico(18:2 n-6)	1,12 \pm 0,12	1,14 \pm 0,18	0,95 \pm 0,17	ND
Razão n6:n3	0,73	0,69	0,69	0,65

ND: não detectado.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos a obesidade provocada pela redução do número de ninhada pelo modelo da programação metabólica. Neste modelo a obesidade é promovida pelo fornecimento de maior aporte de leite aos filhotes durante a lactação, significando maior disponibilidade energética, semelhante ao que ocorre em seres humanos. Considerando a evolução da massa corporal dos filhotes durante o período de lactação, nossos dados corroboram dados da literatura, evidenciando que a redução de ninhada após o 3º dia do nascimento é capaz de induzir sobrepeso dos filhotes (CUNHA, 2007; RODRIGUES et al., 2009; NERY et al., 2011; RINALDI et al., 2012).

Na literatura diversos trabalhos reproduzem o quadro de instalação de obesidade em ratos por superalimentação, elevando o aporte energético (PLAGEMANN et al., 1992; SRINIVASAN, 2003; THOLE et al., 2012; HABBOUT et al., 2013). De maneira semelhante nossos resultados demonstraram aumento significativo da massa corporal dos filhotes a partir do 7º dia de idade no grupo submetido à programação metabólica (RODRIGUES et al., 2007; FISCHER et al., 2015; CAI et al., 2016). A partir desta variável, os animais de ninhada reduzida, parecem ter alcançado estado de obesidade, uma vez que a partir do 7º dia de vida até o final do período de desmame o ganho de peso foi, em média, 26 % maior que o encontrado no grupo controle.

Avaliamos o índice de Lee (IL), um preditor de obesidade, no intuito de se confirmar o estado de obesidade nos animais, o qual considera não apenas a massa corporal dos indivíduos, mas estabelece uma relação entre a massa e o comprimento naso-anal do filhote (BERNARDIS & PATTERSON, 1968). Desta forma, animais de maior tamanho para a idade, não são erroneamente identificados como obesos, criando resultados falso-positivos. Dados da literatura demonstram que abordagens experimentais semelhantes às empregadas neste estudo, identificam que indivíduos obesos apresentam aumento no IL aos 21 dias de vida (FISCHER, 2014). Em nossa abordagem, o IL ao desmame foi 2,45 % maior no grupo obeso quando comparado ao do grupo controle.

Desta forma, a lactação é um período crítico da maturação do SNC, no qual o animal consolida seu comportamento alimentar, em face da disponibilidade de alimento. É sabido que a lactação é um período estritamente crítico na vida do indivíduo, e durante essa etapa ainda ocorre o desenvolvimento e estabelecimento do SNC e do tecido adiposo (WATERLAND & GARZA, 1999; PATEL & SRINIVASAN, 2011). O sobrepeso alcançado durante o período lactacional (0 - 21 dias) pode ser explicado pela menor competição entre os filhotes pelo leite e, conseqüentemente, maior oferta deste leite aos animais de ninhadas reduzidas (MCMILLEN et al., 2005). Além disso, pode-se considerar que a imaturidade do controle da fome e saciedade regulada pelos circuitos hipotalâmicos, também poderiam participar deste cenário (PLAGEMAN et al., 1999). Durante o período de lactação, o leite é a única fonte energética a que o recém-nascido tem contato e sua composição foi adaptada ao longo da evolução para atender as necessidades nutricionais e energéticas para o desenvolvimento adequado dos filhotes (GUILLOTEAU et al., 2009; PATEL & SRINIVASAN, 2011).

Até o terceiro dia de lactação a produção de leite pode ser ajustada de acordo com o número de filhotes da prole. Desta forma, a redução de ninhada neste período crítico garante maior aporte de leite aos filhotes, os quais estarão sujeitos à superalimentação, que como consequência favorecerá o ganho de peso ao longo da vida (PLAGEMAN et al., 1999). Considerando que o leite durante os primeiros 21 dias de vida do animal foi a única fonte de nutrientes, seguindo nesta linha de interesse, foi avaliado o teor proteico e a quantificação lipídica das amostras de leite dentre os grupos CON e OB, a fim de verificar se a redução das ninhadas provocou alterações na composição do leite. A análise de proteínas totais presentes no leite das ratas que foram submetidas à redução de ninhada mostrou um aumento no teor de proteínas de aproximadamente 27 %.

Explorando os ácidos graxos presentes no leite, nosso trabalho mostra pela primeira vez que ocorreram alterações no perfil de ácidos graxos, com redução na quantidade de AGPI's e significativo aumento na disponibilidade de ácidos graxos saturados, que classicamente são empregados na síntese de triacilglicerol (WATANABE et al., 2016). As quantidades do ácido graxo esteárico, um ácido graxo característico para o depósito de gorduras, foram

duas vezes maior nos animais obesos, e estavam acompanhados de uma redução de cerca de 36 % do ácido graxo mirístico. Embora ambos os ácidos sejam saturados, os animais acumulam preferencialmente o ácido esteárico, desta forma a redução na concentração de mirístico, pode ser explicada pela alongação deste ácido graxo em ácido esteárico. Dos lipídios presentes no leite, os triacilgliceróis, são os principais componentes do leite presente na maioria dos mamíferos. Fornecem grande porcentagem de calorias e ácidos graxos necessários para o desenvolvimento neonatal (WATANABE et al., 2016). Além do aumento na concentração de lipídios saturados, as concentrações de AGPI's também sofreu interferência do processo da programação metabólica. O ácido graxo linoléico (18:2-n-6), apresentou aumento moderado de cerca de 17 % e o oleico (18:1-n-9), aumento na ordem de 71 %. Em contrapartida, as concentrações de EPA (20:5-n-3) sofreram redução de 64 % no grupo OB em comparação aos encontrados no grupo controle. Estes dados em conjunto, sugerem que a redução de ninhada causada no grupo OB, provocou alterações na qualidade do leite produzido pelas progenitoras, de produzir um leite com maior concentração de moléculas calóricas. Este aumento poderia estar relacionado às mudanças no comportamento alimentar da progenitora, o que requer futuras investigações para se entender os mecanismos pelos quais a programação metabólica induz tais alterações nutricionais.

Após o desmame, a evolução da massa corporal foi avaliada a partir do 22º dia, três vezes por semana até aos 60 dias. Nossos resultados mostraram que nos grupos obesos (OB) e obesos suplementados (OBS), houve o aumento discreto de ganho de massa, sendo essa mais acentuada no grupo OB. Em outros trabalhos com o modelo da programação metabólica, é mencionado que o aumento do ganho de peso dos animais "imprintados" se torna expressivo a partir dos 70 dias de vida do rato, com tendência progressiva durante a fase adulta do animal (RODRIGUES et al., 2009; FISCHER et al., 2015). Em nossos achados, verificamos que o ganho de peso do animal não foi devido à ingestão excessiva de alimento, pois a avaliação do consumo alimentar revelou a ausência de hiperfagia (XIAO et al., 2007; NERY et al., 2011; FISCHER et al., 2015), embora alguns autores relatem o modelo como hiperfágico (RODRIGUES et al., 2007; RINALDI et al., 2012). Desta

forma podemos sugerir que, uma vez que não houve hiperfagia, o ganho de peso encontrado neste trabalho decorreu do desbalanço metabólico provocado pela redução de ninhada do modelo.

Alterações metabólicas são responsáveis pelo desencadeamento de diversas comorbidades associadas ao ganho de peso (WAJCHENBERG, 2000). Este sobrepeso se caracteriza morfológicamente pelo aumento no tamanho e massa dos panículos adiposos. Em nosso trabalho, embora não tenha sido identificada hiperfagia, durante a dissecação dos animais foi encontrado maiores quantidades de tecido adiposo branco nos ratos do grupo OB. Desta forma, entre as gorduras viscerais avaliadas, a gordura retroperitoneal foi a que apresentou maior aumento, 49 %. Com menor impacto que os resultados obtidos da gordura retroperitoneal, também houve aumento da gordura mesentérica, 33 % e na gordura perigonadal, 35 % quando comparados aos animais controle. Os panículos retroperitoneal e mesentérico são os principais sítios de deposição de gorduras como fonte energética para períodos de privação alimentar. Os aumentos encontrados neste trabalho demonstram a eficiência do modelo da programação metabólica, no desencadeamento de quadro de obesidade (HOU et al., 2012; RINALDI et al., 2012; FISCHER et al., 2015).

Sabemos que uma dieta desequilibrada com altas concentrações de ácidos graxos saturados caracteriza risco para desencadeamento de quadros de obesidade e síndrome metabólica, de processos inflamatórios e consequentemente de patologias relacionadas à ingestão carenciada de AGPI's n-3 e n-6. Desta forma a busca por moléculas ou estratégias que permitam frear o avanço da obesidade ou minimizar os efeitos de comorbidades relacionadas, tem sido objeto de estudo de diversos grupos mundo afora. (HORROCKS & FAROOQUI, 2004; SIMOPOULOS, 2011; JUAREZ-LOPEZ et al., 2013; COLLINS et al., 2015).

Nos últimos anos alguns autores tem buscado compreender como alterações na dieta podem ser refletidas em regulação do metabolismo e de comorbidades associadas ao ganho de peso (LEVIN, 2006; THOLE et al., 2012). Em nossa abordagem experimental, o emprego de suplementação alimentar com óleo de peixe, representou fonte de AGPI's e possibilidade de controle do ganho de peso (DA COSTA et al., 2015; ARNOLDUSSEN et al.,

2016). Nossos resultados mostram que a suplementação com óleo de peixe provocou redução da massa dos tecidos mesentéricos e retroperitoneais, reduzindo ambos os depósitos no grupo OBS para valores próximos aos dos observados no grupo CON (DAI, et al.,2016) .

Para confirmar que o aumento visível da massa dos panículos adiposos, estava correlacionado com um quadro de obesidade, calculou-se novamente o índice de Lee, aos 60 dias. Novamente foi identificado aumento de cerca de 2,5 % no grupo OB, caracterizando que o modelo prosseguiu com quadro de obesidade ainda no rato jovem. Outros tecidos como gordura marrom, fígado e coração, não sofreram alterações em suas massas nos ratos com 60 dias de idade. Neste sentido, o maior aporte de leite durante a lactação sugere alterações no desenvolvimento e estabelecimento do tecido adiposo branco, onde a fonte alimentar com maior poder calórico pode refletir em desequilíbrio neuroendócrino e futuramente acarretar danos à saúde ao longo da vida adulta (RINALDI et al., 2012; FISCHER, 2014).

Em nossos experimentos não encontramos alterações séricas de glicemia em jejum, mas deve-se atentar para o fato que as análises bioquímicas séricas foram realizadas com animais de 60 dias de idade, fator que possa justificar nossos achados e em adição não houve alterações nas concentrações plasmáticas basais de glicose. Da mesma forma a concentração de colesterol total também não sofreu alteração (DAI, et al.,2016), entretanto os triacilgliceróis sofreram aumento de 56 % nos animais OB (XIAO et al., 2007; RINALDI et al., 2012) após jejum de 12 horas, ou seja, havia um estoque energético excessivo disponível na corrente sanguínea. Isso aponta para um maior aporte energético, onde haveria maior disponibilidade calórica do que o necessário, aumentando a concentração de triacilglicerol na corrente sanguínea.

De maneira semelhante aos achados referentes às gorduras, a suplementação com o óleo de peixe rico em AGPI's n-3, no intervalo estudado, foi hábil em promover um desvio no balanço de ácidos graxos para um cenário mais favorável (DAI, et al.,2016). Notamos que a obesidade induzida, diminuiu mais que 25% as concentrações de DHA no plasma do grupo OB quando comparamos com as do grupo CON. Contudo a suplementação foi capaz de reverter este padrão, provocando o aumento de 118 % nas concentrações de

DHA no plasma do grupo OBS. E como esperado, no grupo CONS as concentrações de DHA no plasma estavam aumentadas em 40 %. Outro AGPI's n-3 presente no óleo de peixe, o EPA, foi encontrado em 245 % maior no grupo CONS quando comparado ao grupo CON e no grupo OBS a suplementação provocou o aumento de 161 % quando comparado ao grupo CON. É sabido que quanto maior forem as concentrações de AGPI's adquiridas, esse aumento é importante para a dinâmica imunológica do indivíduo e na proteção contra doenças cardiovasculares e outros eventos como a obesidade (BURROWS et al., 2011; JUAREZ-LOPEZ et al., 2013; POLUS et al., 2016).

Possíveis alterações nos núcleos hipotalâmicos refletem a desorganização do controle da fome e saciedade exercida por neurônios hipotalâmicos, podendo promover o desenvolvimento de quadro de obesidade (PLAGEMANN et al., 1999; BERTHOUD, 2012). O estudo estereológico dos núcleos hipotalâmicos (núcleo arqueado, área hipotalâmica lateral e paraventricular) deste modelo que foi quantificado pela primeira vez neste trabalho, mostrou que a citoarquitetura desses núcleos não sofreu alterações em decorrência do modelo provocado. A ausência de alteração morfológica no hipotálamo ressalta a importância do modelo como ferramenta para compreensão de possíveis eventos periféricos envolvidos na gênese da obesidade. É sabido que atualmente a dieta humana é composta por elevadas concentrações de gorduras saturadas e do tipo trans, que reportam uma dieta hipercalórica. Neste sentido, o modelo da programação metabólica por redução de ninhada se apresenta como um modelo realístico para explicar o estabelecimento da obesidade em humanos, uma vez este trabalho mostra a preservação dos núcleos hipotalâmicos.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos nesse trabalho e base nos estudos encontrados na literatura, podemos concluir que:

1. O modelo da programação por redução de ninhada é capaz de reproduzir um quadro de obesidade e esse se mantém durante a vida adulta do animal.
2. Os núcleos hipotalâmicos não apresentam diminuição do número celular. Isso afirma que a citoarquitetura hipotalâmica é mantida e que os mecanismos pelo qual a obesidade se estabelece são diferentes.
3. A suplementação com óleo de peixe aumenta a concentração de ácidos graxos n-3 nos grupos suplementados, e mostrou-se capaz de melhorar o quadro de obesidade com a diminuição dos tecidos adiposos.

No entanto, a ausência de alterações morfológicas não explica os mecanismos pelos quais o modelo induz o quadro de obesidade, sendo necessários estudos futuros para esclarecer a participação de vias de sinalização do hipotálamo na gênese da obesidade neste modelo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical Chemistry.**, v.40, n. 9, p. 1707-1712, 1994.

AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 8, p. 327-332, 2000.

AKBAR, M.; CALDERON, F.; WEN, Z.; KIM, H. Y. Docosahexaenoic acid: A positive modulator of AKT signaling in neuronal survival. **Proceedings National Academy Science**, v. 102, n. 31, p. 10858-10863, 2005.

ALSAWEED, M.; HARTMANN, P. E., GEDDES, D. T.; KAKULAS, F. MicroRNAs in breast milk and the lactating breast: Potential immunoprotectors and developmental regulators for the infant and the mother. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 11, p. 13981-4020, 2015.

ANSORGE, M. S.; HEN, R.; GINGRICH, J. A. Neurodevelopmental origins of depressive disorders. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 8-17, 2007.

ARNOLDUSSEN, I. A.; et al. Early intake of long-chain polyunsaturated fatty acids preserves brain structure and function in diet-induced obesity. **Journal Nutritional Biochemistry**, v. 30, p. 177-188, 2016.

ARONSON, W. J.; et al. Modulation of omega-3/ omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oil in men with prostate cancer. **Urology**, v. 58, p. 283-288, 2001.

BAGGIO, S. R.; BRAGAGNOLO, N. The effect of heat treatment on the cholesterol oxides, total lipid and fatty acid contents of processed meat products. **Food Chemistry**, v. 95, p. 61—617, 2006.

BALASUBRAMANIAM, A. Clinical potential of neuropeptide Y family of hormones. **The American Journal of Surgery**, v. 183, n. 4, p. 430-434, 2002.

BALBO, S.; et al. Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. **Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology**, v. 108, n. 5-6, p. 291, 2000.

BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 2010.

BERNARDIS, L.; PATTERSON, B. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.

BERTHOUD, H. R. Homeostatic and non homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. **Obesity**, v. 14, n. 5, p. 197-200, 2006.

BERTHOUD, H. R.; MORRISON, C. The brain, appetite, and obesity. **Annual Review Psychology**, v. 59, p. 55-92, 2008.

BERTHOUD, H. R. The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. **Proceeding of Nutrition Society**, v. 71, n. 4, p. 478-487, 2012.

BIRCH, E. E.; e Randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 42, p. 174-181, 2000.

BORSONELO, E. C.; GALDURÓZ, J. C. F. The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: Review and propositions. **Prostaglandins Leukotrienes & Essential fatty Acids**, v. 78, p. 237-245, 2008.

BOULLU-CIOCCA, S.; et al. Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood. **Diabetes**, v. 57, n. 3, p. 669-677, 2008.

BOURET, S. G.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. Simerly formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 2797-2805, 2004.

BOURET, S. G.; SIMERLY, R. Development of Leptin-Sensitive Circuits. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 19, n. 8, p. 575-582, 2007.

BOURET, S. G. Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v, 48, p. S31-S38, 2009.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRETON, C. The hypothalamus–adipose axis is a key target of developmental programming by nutritional manipulation. **Journal of Endocrinology**, v. 216, p. 19–31, 2013.

BROADHURST, C. L.; et al. Brain-specific lipids from marine, lacustrine, or terrestrial food resources: potential impact on early African Homo sapiens. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 131, n. 4, p. 653-673, 2002.

BURROWS, T.; COLLINS, C. E.; GARG, M. L. Omega-3 index, obesity and insulin resistance in children. **International Journal of Pediatric Obesity**, v. 6, n. 2, p. 532-539, 2011.

CAI, G.; ZIKO, I.; et al. Overfeeding during a critical postnatal period exacerbates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge: A role for adrenal melanocortin 2 receptors. **Scientific Reports**, v.6, p. 21097, 2016.

CALDER, P. C.; YAQOOB, P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Postgraduate medicine**, v. 121, n. 6, p. 148-157, 2009.

CAO, P. J.; et al. PAC-1 α may associated with the anti-obesity effect of taurine on rats induced by arcuate nucleus lesion. **Nutrition Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 86-93, 2016.

CASTAÑEDA, J. C. R.; et al. Neonatal exposure to monosodium glutamate induces morphological alterations in suprachiasmatic núcleos of adult rat. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, p. 18-26, 2016.

CETIN, I.; KOLETZKO, B. Long-chain omega-3 fatty acid supply in pregnancy and lactation. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 11, n. 3, p. 297-302, 2008.

CHEN, C. T.; GREEN, J. T.; ORR, S. K.; BAZINET, R. P. Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, p. 85-91, 2008.

CHUNG, W. K; LEIBEL, R. L. Molecular physiology of syndromic obesities in humans. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 16, n. 6, p. 267-272, 2005.

COLL, A. P.; FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. The hormonal control of food intake. **Cell**, v. 129, n. 2, p. 251-262, 2007.

COLLINS, C. T.; et. al. A dose response randomised controlled trial of docosahexaenoic acid (DHA) in preterm infants. **Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 99, p. 1-6, 2015.

COTTRELL, E. C.; OZANNE, S. E. Developmental programming of energy balance and the metabolic syndrome. **Proceeding of Nutrition Society**, v. 66, n. 2, p. 198-206, 2007.

CUNHA, A. C. D. R. Influência da hiperalimentação na lactação sobre o processo de estímulo- secreção de insulina in vitro. 2007. 53 f. **Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental)** – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; ARAÚJO, J. P. **Entendendo a gordura. Os ácidos graxos**. 1. Ed. São Paulo: Manole, 2002.

DA COSTA, C. A.; et al. Body adiposity and bone parameters of male rats from mothers fed diet containing flaxseed flour during lactation. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 7, n. 3, p. 1-6, 2015.

DAI, Y.; et al. A post-weaning fish oil dietary intervention reverses adverse metabolic outcomes and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in postnatal overfed rats. **British Journal of Nutrition**, v. 166, n. 9, p. 1519-1539, 2016.

DE SOUZA, C. T.; et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4192-4199, 2005.

FAROOQUI, A. A.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, function, and involvement in neurological disorders. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.106, p.1-29, 2000.

FAROOQUI, A. A.; HORROCKS, L. A. Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. **Neuroscientist**, v. 12, n. 3, p. 245- 60, 2006.

FAROOQUI, A. A. Lipid mediators in the neural cell nucleus: Their metabolism, signaling and association with neurological disorders. **Neuroscientist**, v. 4, p. 392-407, 2009.

FISCHER, S. V.; et al. Swimming training prevents metabolic imprinting induced by hypernutrition during lactation. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 10, p. 13-20, 2015.

FISCHER, S. V. **O exercício físico e o controle secretor de insulina na obesidade induzida por marcação metabólica**. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva). Universidade Estadual de Ponta Grossa, f.107, 2014.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation 128 and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

GOMES, J. R.; FREITAS, J. R.; GRASSIOLLI, S. Effects of physical exercise on the intestinal mucosa of rats submitted to a hypothalamic obesity condition. **The Anatomical Record**,v. 299, n. 10, p. 1389-196, 2016.

GRINO, M. Prenatal nutritional programming of central obesity and the metabolic syndrome: role of adipose tissue glucocorticoid metabolism. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 5, p. 1233-1235, 2005.

GUILLOTEAU, P.; ZABIELSKI, R.; HAMMON, H.; METGES, C. 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**, v. 60, n. 3, p. 17-35, 2009.

HABBOU, A.; LI, N.; ROCHETTE, L.; VERGELY, C. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short-and Long-Term

Pathophysiological Consequences. **The Journal of nutrition**, v. 143, n. 5, p. 553-562, 2013.

HASCHKE, F.; HAIDEN, N.; THAKKAR, S. K. Nutritive and bioactive proteins in breast milk. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 69, n. 2, p. 17-26, 2016.

HETHERINGTON, A.; RANSON, S. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **The anatomical Record**, v. 78, n. 2, p. 149-172, 1940.

HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, n.4, p. 361-372, 2004.

HOU, M.; et al. The effects of dietary fatty acid composition in the post-sucking period on metabolic alterations in adulthood: Can ω -3 polyunsaturated fatty acids prevent adverse programming outcomes? **Journal of Endocrinology**, v. 215, p. 119-127, 2012.

INNIS, S. M. Perinatal biochemistry and physiology of long chain polyunsaturated fatty acids. **Journal Pediatric**, v. 143, p. 1-8, 2003.

INNIS, S. M. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 554, p. 27-43, 2004.

INNIS, S. M. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. **American Society for Nutrition**, v. 137, n. 4, p. 855-859, 2007.

INNIS, S. M. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. **Brain Research**, v. 1237, p. 35-43, 2008.

JIN, Y. J.; et al. BDNF levels in adipose tissue and hypothalamus were reduced in mice with MSG-induced obesity. **Nutritional Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 376-382, 2015.

JUAREZ-LOPEZ, C.; et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid reduce insulin resistance and triglycerides in obese children and adolescents. **Pediatric Diabetes**, v. 14, n. 5, p. 377-383, 2013.

KENNEDY, G. The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 9-17, 1957.

KENNY, P. J. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, p. 638-651, 2011.

KING, B. M. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. **Physiology Behavior**, v. 87, n. 2, p. 221-244, 2006.

LAFLAMME, D. P. Companion animals symposium: Obesity in dogs and cats: What is wrong with being fat? **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 5, p. 1653-1662, 2012.

LECHNER, B. E.; VOHR, B. R. Neurodevelopmental outcomes of preterm infants fed human milk: A systematic review. **Clinics Perinatology**, v. 44, n. 1, p. 69-83, 2017.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Ed. Artmed, São Paulo, p. 357-380, 2014.

LEVIN, B. E. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1471, p. 1107-1121, 2006.

LEWIS, E. D.; RICHARD, C.; LARSEN, B. M., FIELD, C. J. The importance of human milk for immunity in preterm infants. **Clinics in Perinatology**, v. 44, n. 1, p. 23-47, 2017.

LI, D. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and non-communicable diseases: meta-analysis based systematic review. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 24, n. 1, p.10-15, 2015.

LIBUDA, L.; et al. Frequencies and demographic determinants of breastfeeding and DHA supplementation in a nationwide sample of mothers in Germany. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n. 6, p. 1335-1344, 2014.

LOBSTEIN, T.; BAUR, L.; UAUY, R. Obesity in children and Young people: a crisis in public health. **Obesity Reviews**., v. 5, n. 1, p. 4-104, 2004.

LOUGHRILL, E.; ZAND, N. An investigation into the fatty acid content of selected fish-based commercial infant foods in the UK and the impact of commonly practiced re-heating treatments used by parents for the preparation of infant formula milks. **Food Chemistry**, v. 197, p. 783-789, 2016.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**. v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

MCMILLEN, I. C.; ADAM, C. L.; MÜHLHÄUSLER, B. S. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. **The Journal of Physiology**, v. 565, n. 1, p. 9-17, 2005.

MIRANDA, R. A.; et al. HPA axis and vagus nervus function are involved in impaired insulin secretion of MSG-obese rats. **Journal of Endocrinology**, v. 230, n. 1, p. 27-38, 2016.

NERY, C. D. S; et al. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, p. 49-55, 2011.

NISHIYAMA – NARUKE, A.; SOUZA, J. A.; CARNELLÓS, M.; CURI, R. HPLC Determination of underivatized fatty acids saponified at 37° C analysis of fatty acids in oils and tissues. **Analytical Letters**, v. 31, n. 14, p. 2565-2576, 1998.

ONG, W. Y.; FAROOQUI, T.; KOKOTOS, G.; FAROOQUI, A. A. Synthetic and natural inhibitors of phospholipase A2: Their importance for understanding and treatment of neurological disorders. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 814-831, 2015.

ONIS, M.; BLÖSSNER, M. Prevalence and trends of overweight among preschool children in developing countries. **The American Journal Clinical.Nutrition**, v. 72, n. 4, p. 1032-1039, 2000.

OTTO, S. J.; et al. Maternal and neonatal essential fatty acid status in phospholipids: an international comparative study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 232-242, 1997.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 58, n. 2, p. 18-28, 2011.

PAZ-FILHO, G. J. The effects of leptin replacement on neural plasticity. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.

PAXINOS, G. & WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. The New Coronal Set, 5th edition Book. **Elsevier Academic Press**, 2004.

PHILLIPS, C. M. Nutrigenetics and metabolic disease: current status and implications for personalised nutrition. **Nutrients**, v. 05, n. 01, p. 32-57, 2013.

PLAGEMANN, A.; et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 99, n. 03, p. 154-158, 1992.

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

PLAGEMANN, A. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptideY – system in neonatally overfed weanling rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, n. 7, p. 541-546, 1999.

PLAGEMANN, A. Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. **Physiology Behavior**, v. 86, n. 5, p. 661-668, 2005.

PLAGEMANN, A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. **Hormone Research**, v. 65, n. 3, p. 83-89, 2006.

POLUS, A.; et al. Omega-3 fatty acid supplementation influences the whole blood transcriptome in women with obesity, associated with pro-resolving lipid mediator production. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1861, n.11, p. 1746-1755, 2016.

RAKIC, P.; AYOUB, A. E.; BREUNIG, J. J.; DOMINGUEZ, M. H. Decision by division: making cortical maps. **Trends in Neuroscience**, v. 32, n. 5, p. 291-301, 2009.

RINALDI, W.; et al. Effect of small litter size on the autonomic and metabolic responses of Wistar rats. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 321-330, 2012.

ROCCHINI, A. A. P. Childhood obesity and a diabetes epidemic. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 11, p. 854-855, 2002.

RODRIGUES, A. L.; DE MOURA, E. G.; PASSOS, M. C.; DUTRA, S. C.; LISBOA, P. C. Postnatal early overnutrition changes the leptin signaling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 11, p. 2647-2661, 2009.

RODRIGUES, A. L.; et al. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. **Journal of Endocrinology**, v. 195, n. 3, p. 485-494, 2007.

SÁNCHEZ, J. C. Papel Fisiológico de la Leptina. **Colomb Med**, v. 36, p. 50-59, 2005.

SANDOVAL, D.; COTA, D; SEELEY, R. J. The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. **Annual Review of Physiology**, v. 70, p. 513-535, 2008.

SCHIEFERMEIER, M.; YAVIN, E. n-3 Deficient and docosahexaenoic acid enriched diets during critical periods of the developing prenatal rat brain. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 1, p.124-131, 2002.

SEGOVIA, S. A.; VICKERS, M. H.; GRAY, C.; REYNOLDS, C. M. Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. **Biomed Research International**, v. 2014, 2014.

SHAPIRO, H. Could n-3 polyunsaturated fatty acids reduce pathological pain by direct action on the nervous system? **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, p. 219-224, 2003.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 balance in health and disease: evolutionary aspects of diet. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 102, p. 10-21, 2011.

SINGH, R. K.; KUMAR, P.; MAHALINGAM, K.. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 2, p. 87-108, 2016.

SOUZA, F.; et al. Efeito da vagotomia troncular em ratos injetados na fase neonatal com glutamato de sódio: estudo biométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.16, 2001.

SRINIVASAN, M. Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. **Experimenta Biology and Medicine**, v. 228, n. 1, p. 15-23, 2003.

STANLEY, S.; WYNNE, K.; MCGOWAN B.; BLOOM, S. Hormonal Regulation of Food Intake. **Physiological Reviews**. v. 85, n. 4, p. 1131-1158, 2005.

SUZUKI, K.; JAYASENA, C. N.; BLOOM, S. R. Obesity and appetite control. **Experimental diabetes research**, v. 2012, 2012.

THOLE, A. A et al. Progenitor cells and TNF-alpha involvement during morphological changes in pancreatic islets of obese mice. **Tissue Cell**, v. 44, n. 4, p. 238–248, 2012.

TIAN, X.; et al. CREG1 heterozygous mice are susceptible to high fat diet-induced obesity and insulin resistance. **Plos One**, v. 5, n. 12, p. 1-17, 2017.

TSUNEKAWA, T.; et al. Deficiency of PTP1B attenuates hypothalamic inflammation via activation of the JAK2-STAT3 pathway in microglia. **Ebiomedicine**, v. 16, p. 172-183, 2017.

VELLOSO, L. A.; SCHWARTZ, M. W. Altered hypothalamic function in diet induced obesity. **International Journal of Obesity**, v. 35, n. 12, p. 1455-1465, 2011.

VOLKER, D.; GARG, M. Dietary n-3 fatty acid supplementation in rheumatoid arthritis-mechanisms, clinical outcomes, controversies, and future directions. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 7, p. 87-87, 1997.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 6, p. 697-738, 2000.

WATANABE, N.; et al. Quantification of triacylglycerol positional isomers in rat milk. **Journal of Oleo Science**, v. 65, n. 12, p. 977-983, 2016.

WATERLAND, R. A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 69, n. 2, p. 179-197, 1999.

WISSE, B. E.; KIM, F.; SCHWARTZ, M. W. Physiology. An integrative view of obesity. **Science**, v. 318, n. 5852, Nov 9, p. 928-9. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mapa da obesidade**. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade>>. Acesso em 24/03/2016.

XIAO, X. Q.; et al. Excess weight gain during the early postnatal period is associates with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis. **Endocrinology**, v. 148, n. 9, p. 4150-4159, 2007.

YANG, X.; SMITH, U. Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? **Diabetologia**, v. 50, n. 6, p. 1127-1139, 2007.

YOU DIM, K. A., MARTINA; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain; possible health implications. **International Journal of developmental Neuroscience**, v.18, p.383-399, 2000.

YOUNG, C.; MARTIN, A. Omega-3 fatty acids and mood disorders: an overview. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 3, p. 184-187, 2003.

ZELEZNÁ, B.; et al. Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice. **Physiology Research**, v. 58, n. 5, p. 717-723, 2009.

ZHU, S.; et al. Developmental programming of energy balance regulation: is physical activity more 'programmable' than food intake? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 75, n. 1, p. 73-77, 2015.

8 ANEXO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 951

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.106494/2015-51


APROVADO/APPROVAL: 12/04/2016 – R.O. 03/2016

TÍTULO: Efeito do óleo de peixe sobre as alterações hipotalâmicas induzidas pelo modelo da programação metabólica por redução de ninhada em ratos Wistar.

TITLE: Effect of fish oil upon hypothalamic alteration in rats induced to metabolic imprinting.

AUTORES/AUTHORS: Katya Naliwaiko, Bruna Aparecida Cornotti de Oliveira, Juliana Becker de Godoy, Adam Hideo Sugli, Rodrigo Schuh, Stefani Fischer, Aldre Izabel Tanhoffer, Ricardo Antonio Tanhoffer, Djanira Aparecida da Luz Veronez,

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Biologia Celular


 Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
 Coordenadora da CEUA