



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Ellen Paula Santos da Conceição

**Efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a plasticidade
ontogenética no modelo de superalimentação pós-natal**

Rio de Janeiro

2016

Ellen Paula Santos da Conceição

Efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a plasticidade ontogenética no modelo de superalimentação pós-natal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C744 Conceição, Ellen Paula Santos da.

Efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a plasticidade ontogenética no modelo de superalimentação pós-natal / Ellen Paula Santos da Conceição. – 2016.

113 f.

Orientadora: Patrícia Cristina Lisboa da Silva.

Coorientadora: Elaine de Oliveira.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Cálcio na Dieta - Uso terapêutico. 2. Obesidade - Teses. 3. Adiposidade - Teses. 4. Estresse oxidativo - Nutrição - Teses. 5. Cálcio - Metabolismo - Teses. I. Silva, Patrícia Cristina Lisboa da. II. Oliveira, Elaine de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV Título.

CDU 613.2

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

Assinatura

Data

Ellen Paula Santos da Conceição

Efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a plasticidade ontogenética no modelo de superalimentação pós-natal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2016.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira

Instituto de Nutrição - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra Angela de Castro Resende

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias

Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Rodrigo Soares Fortunato

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus familiares, amigos e companheiros de bancada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Patricia Cristina Lisboa por permitir que eu desenvolvesse minha tese no LFE e por toda paciência e atenção.

À minha co-orientadora Elaine de Oliveira pela paciência, compreensão e dedicação em me ajudar no desenvolvimento dessa tese e nos trabalhos de bancada. Ao professor Egberto Gaspar de Moura por ter me orientado em grande parte de minha iniciação no laboratório.

Aos estudantes de iniciação científica e também aos pós-graduandos.

Aos meus PAIS, Suzanete e Francisco, e aos meus queridos IRMÃOS, Isa, Ana e Gilson, pela paciência em tolerar a minha ausência, pelo incentivo e pelo amor que nunca me foi negado.

E por fim, a DEUS pela oportunidade e pelo privilégio em compartilhar tamanha experiência

"A cada dia Deus nos dá uma tela nova,
quem escolhe as cores somos nós"

Frei Clemente Kesselmeier

RESUMO

CONCEIÇÃO, Ellen Paula Santos. *Efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a plasticidade ontogenética no modelo de superalimentação pós-natal* 2016. 113 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A obesidade está relacionada com o desenvolvimento da diabetes, estresse oxidativo, esteatose hepática, alteração da sensibilidade hormonal e redução da capacidade termogênica pelo tecido adiposo marrom (TAM). Na obesidade, alterações do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico podem levar ao vício por alimentos palatáveis. Todas estas características contribuem para o baixo gasto energético e o alto consumo alimentar. Para estudar os efeitos em longo prazo da obesidade infantil, utilizamos o modelo de redução do tamanho da ninhada. Para induzir a superalimentação neonatal, o tamanho da ninhada foi reduzido para 3 filhotes machos de PN3 – 21 (grupo SL). O grupo controle permaneceu com 10 filhotes (grupo NL). Em PN120, o grupo SL foi dividido em: SL – que recebeu ração controle e SL-Ca que recebeu dieta controle suplementada com 10g/kg de CaCO₃. Os sacrifícios ocorreram em PN120 e PN180. Durante todo o período experimental, avaliamos o consumo alimentar e peso corporal. Em PN175, avaliamos a preferência alimentar dos animais por uma dieta rica em açúcar ou em lipídio. Avaliamos os hormônios por ELISA, RIA e quimioluminescência; o conteúdo proteico por Western blotting no fígado, tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM), adrenal e regiões cerebrais; as atividades enzimáticas no soro e no fígado por cinética enzimática. Em PN21, PN120 e PN180, avaliamos *in vivo* a atividade simpática do TAM. Ao desmame, os ratos SL apresentaram maior estado pró-oxidativo no fígado e plasma e menor sensibilidade às catecolaminas no TAB. Na idade adulta, a suplementação é capaz de melhorar o estado pró-oxidativo no fígado e plasma, a sensibilidade à insulina e a microesteatose no fígado. Tanto a alteração de metabolismo/ação da vitamina D e do glicocorticóide no tecido adiposo como a menor capacidade termogênica do TAM contribuem para a maior adiposidade dos animais do grupo SL. A suplementação com cálcio corrigiu parte dessas alterações. A superalimentação pós-natal levou a redução da via dopaminérgica e a maior preferência por gordura, enquanto a suplementação com cálcio normalizou esta via apenas a nível hipotalâmico e corrigiu a preferência alimentar. Nossos dados destacam o impacto benéfico da suplementação dietética com cálcio, que pode ter um papel nutricional promissor para auxiliar a perda de peso e minimizar os distúrbios relacionados a obesidade e a síndrome metabólica dos animais obesos que foram superalimentados na lactação.

Palavras-chave: Cálcio. Obesidade. Estresse Oxidativo. Fígado. Hormônios. Sistema dopaminérgico.

ABSTRACT

CONCEIÇÃO, Ellen Paula Santos. *Effect of dietary supplementation with calcium on ontogenetic plasticity in the postnatal overfeeding model*. 2015. 113 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Obesity is associated with diabetes, oxidative stress, liver steatosis, changes in hormonal sensitivity and reduction of the thermogenic capacity of the brown adipose tissue (BAT). In obesity, changes in mesocorticolimbic dopaminergic signaling can lead to palatable food addiction. All these features contribute to low energy expenditure and high food intake. To evaluate the long-term effects of childhood obesity we used the model of litter size reduction. The litters were adjusted to three pups at the 3rd day of lactation (SL group). The control group contained 10 pups per litter until weaning (NL group). On PN120, SL offspring were subdivided into: SL (standard diet); SL-Ca (calcium supplementation – 10 g CaCO₃/kg chow – for 60 days). Food intake and body weight were recorded during the all period. On PN175, animals were subjected to a food challenge: animals could choose between high-fat (HFD) and high-sucrose diets (HSD). We evaluated: hormones (ELISA, RIA and chemiluminescence), the protein contents in liver, visceral adipose tissue (VAT), BAT and in brain areas (Western blotting) and the enzymatic activities in liver and plasma (kinetics assays). At PN21, PN120 e PN180, the BAT autonomic nerve function was determined *in vivo*. At weaning, the SL rats had high higher oxidative stress in liver and plasma and lower VAT catecholamine sensitivity. At adulthood, the calcium supplementation was able to improve the redox balance liver and plasma, the insulin sensitivity, and the liver steatosis. The alteration in the metabolism /action of vitamin D and glucocorticoids in the VAT as well as the reduced BAT thermogenic capacity contributed to the higher visceral adiposity in SL group. The calcium supplementation normalized, in part, these changes. The postnatal early overfeeding reduced the brain dopaminergic signaling and increased the preference for fat, while the calcium supplementation normalized the dopaminergic signaling in hypothalamus and the food preference. Our data highlight the benefits of the dietetic calcium supplementation, which can be promising to minimize the disruptions associated with obesity and metabolic syndrome in obese animals overfeed during the lactation.

Keywords: Calcium. Obesity. Oxidative stress. Liver. Hormones. Dopaminergic system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|--------------|--|----|
| Figura 1 – | Biossíntese de catecolaminas em células cromafins da adrenal | 28 |
| Quadro 1 – | Característica dos receptores adrenérgicos | 30 |
| Figura 2 – | Ativação e inativação da vitamina D | 35 |
| Figura 3 – | Esquema do modelo experimental de redução da ninhada | 45 |
| Quadro 2 – | Primes utilizados | 52 |
| Gráfico 1 – | O efeito da redução do tamanho da ninhada sobre marcadores e adipogênicos lipogênicos no tecido adiposo visceral aos 21 dias de idade..... | 57 |
| Gráfico 2 – | O efeito da redução do tamanho da ninhada sobre marcadores lipogênicos no tecido adiposo visceral aos 21 dias de idade..... | 58 |
| Gráfico 3 – | O efeito da redução do tamanho da ninhada na morfologia dos adipócitos aos 21 dias de idade..... | 59 |
| Gráfico 4 – | O efeito da redução do tamanho da ninhada no metabolismo dos lipídios no fígado, aos 21 dias de idade..... | 60 |
| Gráfico 5 – | O efeito da redução do tamanho da ninhada sobre o conteúdo proteico de enzimas antioxidantes no fígado aos 21 dias de idade..... | 62 |
| Gráfico 6 – | O efeito da redução do tamanho da ninhada sobre o peroxidação e oxidação de proteínas..... | 64 |
| Gráfico 7 – | O efeito da redução do tamanho da ninhada sobre as enzimas de função hepática aos 21 dias de idade..... | 65 |
| Gráfico 8 – | O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a preferência por ração hiperglicídica ou hiperlipídica..... | 67 |
| Gráfico 9 – | O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre o conteúdo de TH em PN 180 no VTA..... | 68 |
| Gráfico 10 – | O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a sinalização domaminérgica no NAc..... | 69 |
| Gráfico 11 – | O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre o ARC..... | 70 |
| Gráfico 12 – | O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre o peso corporal e adiposidade..... | 72 |

| | |
|--|----|
| Gráfico 13 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a área de adipócitos do tecido adiposo epididimal..... | 73 |
| Gráfico 14 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a leptinemia..... | 74 |
| Gráfico 15 – O efeito da suplementação dietética com cálcio no sobre parâmetros hepáticos..... | 75 |
| Gráfico 16 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a histologia hepática..... | 76 |
| Gráfico 17 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre o conteúdo Akt fígado..... | 78 |
| Gráfico 18 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre marcadores de estresse oxidativo no fígado..... | 83 |
| Gráfico 19 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre marcadores de estresse oxidativo no plasma..... | 86 |
| Gráfico 20 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre o metabolismo e ação da vitamina D..... | 87 |
| Gráfico 21 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre o metabolismo e ação da corticosterona..... | 88 |
| Gráfico 22 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a inervação do TAM..... | 89 |
| Gráfico 23 – O efeito da suplementação dietética com cálcio na expressão proteica no TAM..... | 90 |
| Gráfico 24 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a histologia do TAM..... | 91 |
| Gráfico 25 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre reguladores da atividade simpática do TAM..... | 92 |
| Gráfico 26 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a função simpatoadrenal..... | 93 |
| Gráfico 27 – O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre parâmetros cardiovasculares..... | 94 |

..

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 – | Composição das dietas ofertadas no estudo de preferência alimentar..... | 47 |
| Tabela 2 – | Especificações para obtenção das regiões cerebrais estudadas | 49 |
| Tabela 3 – | Parâmetros referentes ao sistema nervoso autônomo em PN21..... | 61 |
| Tabela 4 – | Atividade das enzimas antioxidantes em PN21..... | 63 |
| Tabela 5 - | Marcadores de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica no plasma em PN21. | 65 |
| Tabela 6 – | Glicemia e insulinemia em PN120 e PN180..... | 77 |
| Tabela 7 – | Parâmetros bioquímicos plasmáticos em PN120 e PN180..... | 79 |
| Tabela 8 - | Atividade das enzimas antioxidantes no fígado em PN120 e PN180..... | 81 |
| Tabela 9 - | Atividade das enzimas antioxidantes no plasma em PN120 e PN180..... | 85 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| 11 β -HSD 1 | 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 |
| ACC | Acetil-coa carboxilase |
| AgRP | Peptídeo relacionado a agouti |
| AMPc | Cyclic adenosine monophosphate |
| ARC | Núcleo arqueado |
| C/EBPs | CCAAT/enhancer binding proteins |
| CART | Transcrito regulado por anfetamina e cocaína |
| ChREBP | Carbohydrate response element-binding protein |
| CPT1 | Carnitina palmitoil transferase 1 |
| CRH | <i>Corticotropin-releasing hormone</i> |
| CTEM | Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial |
| CuZnSOD | Superóxido dismutase cobre e zinco |
| DMN | Hipotálamo dorsomedial |
| DOPA-d | DOPA-descarboxilase |
| D β H | Dopamina β -hidroxilase |
| ERN | Espécies reativas de nitrogênio |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| FADH2 | Dinucleótido de flavina e adenina |
| FAS | Ácido graxo sintase |
| FNMT | Feniletanolamina N-metiltransferase |
| FXR | Bile acid receptor/farnesoid X receptor |
| GC | Glicocorticoides |
| GPx | Glutathione peroxidase |
| GR | Glutathione reductase |
| HSL | Lipase homônimo sensível |
| JAK2 | <i>Janus kinase 2</i> |
| L-DOPA | 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina |
| LPL | Lipoproteína lípase |
| MnSOD | Superóxido dismutase manganês |
| NAc | Núcleo accumbens |

| | |
|------------------|---|
| NADH | Dinucleótido de nicotinamida e adenina |
| NADPH | Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina |
| NAFLD | Nonalcoholic fatty liver disease |
| NPY | Neuropeptídeo Y |
| OLETF | Otsuka long-evans tokushima fatty |
| PKA | Proteína quinase A |
| POMC | Pró-opiomelanocortina |
| PPAR γ | Peroxisome proliferation-activator receptor γ |
| PVN | Hipotálamo paraventricular |
| SNA | Sistema nervoso autônomo |
| SNP | Sistema nervoso parassimpático |
| SNS | Sistema nervoso simpático |
| SOCS3 | <i>Suppressor of cytokine signaling 3</i> |
| SREBP-1c | Sterol regulatory element- binding protein |
| STAT3 | <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> |
| T3 | Triiodotironina |
| TAB | Tecido adiposo branco |
| TAM | Tecido adiposo marrom |
| TH | Tirosina hidroxilase |
| TNF-alfa | Factor de necrose tumoral |
| TRH | Thyrotropin-releasing hormone |
| UCP1 | Proteína desacopladora 1 |
| VDR | Receptor de vitamina D |
| Vitamina D ativa | 1-25(OH) $_2$ vitamina D |
| VMN | Hipotálamo ventromedial |
| VTA | Área ventral tegumentar |
| α -MSH | Hormônio estimulador de melanócitos α |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-------------------|---------------------|
| % | Porcentagem |
| ± | Mais ou menos |
| × | Multiplicação |
| β | Beta |
| H ₂ O | Molécula da água |
| mL | Mililitro |
| cm | Centímetro |
| cm ³ | Centímetros cúbicos |
| rpm | Rotações por minute |
| α | Alfa |
| O ₂ | Oxigênio molecular |
| CaCO ₃ | Carbonato de cálcio |

SUMÁRIO

| | | |
|------|--|----|
| | INTRODUÇÃO | 15 |
| 1 | OBJETIVOS | 42 |
| 1.1 | Objetivo geral | 42 |
| 1.2 | Objetivos específicos | 42 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 44 |
| 2.1 | Modelo experimental | 44 |
| 2.2 | Preparo da ração suplementada com carbonato de cálcio | 45 |
| 2.3 | Avaliação do estado nutricional | 46 |
| 2.4 | Estudo de preferência alimentar | 46 |
| 2.5 | Eutanasia | 47 |
| 2.6 | Atividade Elétrica dos Nervos Parassimpático e Simpático | 48 |
| 2.7 | Avaliação da adiposidade visceral | 48 |
| 2.8 | Isolamento da área tegumentar ventral (VTA), núcleo accumbens (NAc) striatum dorsal (DS), núcleo arqueado (ARC) e núcleo para ventricula (PVN). | 49 |
| 2.9 | Determinação das concentrações plasmáticas hormonais | 49 |
| 2.10 | Análise da expressão de proteínas por Western Blotting | 50 |
| 2.11 | Ensaio de Real Time-PCR | 52 |
| 2.12 | Determinação de catecolaminas totais na adrenal | 53 |
| 2.13 | Triglicerídeo e colesterol hepático | 53 |
| 2.14 | Atividade enzimática antioxidante | 54 |
| 2.15 | Avaliação da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico | 54 |
| 2.16 | Determinação da concentração de grupamentos carbonilados em proteínas | 55 |
| 2.17 | Análises histológicas | 55 |
| 2.18 | Análise Estatística | 56 |
| 3 | RESULTADOS | 57 |
| 3.1 | Efeito da superalimentação sobre marcadores de adipogênese no TAV ao desmame | 57 |
| 3.2 | Efeito da superalimentação sobre marcadores de lipogênese TAV ao desmame | 58 |
| 3.3 | Efeito da superalimentação sobre a adiposidade visceral ao desmame | 58 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.4 | Efeito da superalimentação sobre marcadores de lipogênese no fígado ao desmame | 59 |
| 3.5 | Efeito da superalimentação sobre a função simpatoadrenal | 60 |
| 3.6 | Efeito da superalimentação sobre o conteúdo proteico de enzimas antioxidantes no fígado ao desmame | 61 |
| 3.7 | Efeito da superalimentação sobre a atividade de enzimas antioxidantes ao desmame | 62 |
| 3.8 | Efeito da superalimentação sobre marcadores de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica no fígado ao desmame | 63 |
| 3.9 | Efeito da superalimentação sobre marcadores de lesão hepática ao desmame . | 64 |
| 3.10 | Efeito da superalimentação sobre marcadores de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica no fígado ao desmame | 65 |
| 3.11 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a preferência alimentar | 66 |
| 3.12 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a sinalização dopaminérgica mesocorticolímbica no VTA | 67 |
| 3.13 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a sinalização dopaminérgica mesocorticolímbica no NAc | 68 |
| 3.14 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a sensibilidade dopaminérgica hipotalâmica | 70 |
| 3.15 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre o peso corporal e adiposidade visceral | 71 |
| 3.16 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a histologia do TAB epididimal | 73 |
| 3.17 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a leptinemia | 73 |
| 3.18 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a lipogênese hepática em PN120 e PN180 | 74 |
| 3.19 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a lipogênese hepática em PN120 e PN180 | 75 |
| 3.20 | Efeito de uma dieta rica em cálcio sobre a glicemia e insulinemia em PN120 e PN180 | 76 |
| 3.21 | Efeito de uma dieta rica em cálcio sobre a sensibilidade hepática a insulina em PN120 e PN180 | 77 |
| 3.22 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos em PN120 e PN180 | 78 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.23 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a atividade de enzimas antioxidantes no fígado em PN120 e PN180 | 80 |
| 3.24 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a marcadores de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica no fígado em PN120 e PN180 | 82 |
| 3.25 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a atividade de enzimas antioxidantes no plasma em PN120 e PN180 | 83 |
| 3.26 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a marcadores de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica no plasma | 86 |
| 3.27 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre o metabolismo e ação da vitamina D no TAB epididimal | 86 |
| 3.28 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre o metabolismo e ação da corticosterona no TAB epididimal | 88 |
| 3.29 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre o TAM | 89 |
| 3.30 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a histologia do TAM | 90 |
| 3.31 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a sinalização hipotalâmica de regulação da atividade simpática | 91 |
| 3.32 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a função simpatoadrenal | 92 |
| 3.33 | Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre parâmetros cardiovasculares..... | 93 |
| 4 | DISCUSSÃO | 95 |
| | REFERÊNCIAS | 98 |

INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma pandemia (WHO, 2015; Finkelstein et al., 2014), assumindo grande importância por estar relacionada ao desenvolvimento de doenças como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e esteatose. Segundo estimativas globais, 39% da população mundial adulta está acima do peso e cerca de 13% está obesa; enquanto 42 milhões de crianças com menos de 5 anos estão com sobrepeso ou obesidade (WHO, 2015). Isto é especialmente preocupante, pois se sabe que crianças obesas tendem a se tornarem adultos obesos e manifestar precocemente as doenças relacionadas à obesidade (Beilin & Huang, 2008; Reilly & Kelly, 2011).

A obesidade pode resultar de um desequilíbrio energético caracterizado pelo elevado consumo de alimentos de alta densidade calórica, somada a inatividade física (Beilin & Huang, 2008). A obesidade tem origem multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais, socioculturais e econômicas (Monteiro *et al.*, 2000; Levy-Costa *et al.*, 2005). Atualmente grande parte dos estudos voltados para a compreensão do desenvolvimento da obesidade está centrado em desvendar como influências ambientais e comportamentais interagem com fatores genéticos para o desenvolvimento da obesidade e dos distúrbios relacionados (Pheiffer et al., 2015; Chesi & Grant, 2015).

Considerando o impacto socioeconômico da obesidade, diversas estratégias têm sido estudadas para prevenir ou reverter o seu estabelecimento, assim como minimizar ou curar suas consequências sobre a saúde e comportamento.

Tecido adiposo

Em mamíferos, o tecido adiposo pode sofrer atrofia, hipertrofia e/ou hiperplasia em decorrência da oferta de nutrientes ou estado de saúde. Desta forma, o tecido adiposo atua como um sistema tampão da quantidade circulante de lipídios, realizando adipogênese e lipogênese em situação de alta ingestão calórica e lipólise em caso de baixa ingestão calórica.

Existem dois tipos de tecido adiposo, o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM) (Adamczak e Wiecek, 2013). O adipócito do TAB armazena os triglicerídeos (TG) em uma única grande gotícula no centro da célula, já o adipócito do TAM possui várias microgotículas dispersas pelo citoplasma e numerosas mitocôndrias. O TAB é a forma mais abundante e é localizado na região subcutânea e

em depósitos viscerais circundando órgãos internos (coração, intestinos, rins e gônadas). Além de estocar energia na forma de TG, o TAB também produz adipocinas que regulam o balanço energético (resistina, leptina e adiponectina), a pressão arterial (angiotensinogênio), além de produzir citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e interleucina-6) (Leal & Mafra, 2013; Adamczak e Wiecek, 2013). O TAM está relacionado como a oxidação de ácidos graxos e geração de calor em resposta a estimulação pelo sistema nervoso simpático (Tupone et al., 2014) e pela triiodotironina (T3) (Ribeiro et al., 2010). Na adaptação ao frio, o consumo de oxigênio pelo TAM pode aumentar 20-30 vezes, mas a energia produzida é dissipada na forma de calor, em vez da produção de ATP. Isso ocorre devido a proteína desacopladora 1 (UCP1), que permite o desacoplamento da fosforilação oxidativa na formação de ATP no processo de respiração celular (Watanabe et al., 2008). A sua capacidade de dissipar a energia em forma de calor levantou a hipótese de que o TAM também pode ser um "tecido anti-obesogenico" (Saito, 2013).

Metabolismo lipídico na obesidade

O aumento da massa do tecido adiposo na obesidade é determinado pelo aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) e/ou do seu número (hiperplasia). Modificações no tamanho de adipócitos maduros ocorrem em resposta a lipogênese e a lipólise (Rosen et al., 2006). No entanto, modificações no número de adipócitos (hiperplasia) dependem da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, processo denominado adipogênese (Queiroz et al., 2009).

Na fase inicial do processo de diferenciação dos adipócitos, as células-tronco mesenquimais multipotentes residentes no estroma do tecido adiposo recebem estímulos que as tornam comprometidas com a diferenciação em pré-adipócitos (Li et al., 2010; Queiroz et al., 2009). Os pré-adipócitos adquirem características de adipócitos maduros, acumulando gotas de gordura, se tornando responsivos a estímulos hormonais, caracterizando a fase terminal da adipogênese. A ativação dos eventos iniciais é dependente da expressão das proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (CCAAT/enhancer binding proteins, C/EBPs): C/EBP- β e C/EBP- δ , que são os primeiros fatores de transcrição. Na diferenciação terminal do pré-adipócito tanto o C/EBP- β quanto o C/EBP- δ ativam os dois principais reguladores centrais da adipogênese: C/EBP- α e peroxisome proliferation-activator receptor γ (PPAR γ) que ativam a expressão da maioria dos demais genes adipogênicos. Esses fatores nucleares,

em particular o PPAR γ , são essenciais na expressão da lipoproteína lipase (LPL) e da ácido graxo sintase (FAS), duas enzimas importantes no acúmulo de lipídeos no interior dos adipócitos (Fonseca-Alaniz et al., 2006, Queiroz et al., 2009).

Em mamíferos, a lipogênese é estimulada pela presença de insulina e glicose no estado pós-prandial. Esses sinais ativam os fatores de transcrição de ChREBP (carbohydrate response element-binding protein), SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein), PPAR γ e FXR (bile acid receptor/farnesoid X receptor), que promovem a expressão de enzimas chaves lipogênicas, a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a FAS (Kallwitz et al., 2008). Assim, o excesso de glicose convertido a piruvato na glicólise é utilizado na lipogênese para síntese de ácidos graxos. Estes podem sofrer esterificação e serem armazenados no tecido adiposo ou em órgãos ectópicos, ou serem exportados para outros tecidos, tais como fígado, músculo e pâncreas, conjugados a proteínas plasmáticas transportadoras.

Em condição de jejum, vias lipolíticas são ativadas para a disponibilização da energia armazenada na forma de ácidos graxos para as atividades metabólicas. A lipólise é estimulada principalmente pelas catecolaminas e inibida pela insulina (Jocken e Blaak, 2008). Indiretamente, os glicocorticóides também estimulam a lipólise ao aumentar expressão de receptores de catecolaminas (Barnes et al., 1984). As catecolaminas estimulam a lipólise ao ligarem-se aos adrenoreceptores β 3 acoplados a proteína G estimulatória o que leva a ativação da adenilato ciclase e consequente aumento da produção de AMPc (cyclic adenosine monophosphate). Isto por sua vez ativa a proteína quinase A, que fosforila a lipase homônimo sensível (HSL) e perilipina, estas quando fosforiladas levam a hidrólise do triglicerídeo armazenado em ácidos graxos não esterificados e glicerol (Chaves et al., 2011). No fígado, o glucagon ao se ligar ao seu receptor também ativa a adenilato ciclase, contribuindo para a lipólise do triglicerídeo estocado no hepatócito (Sharabi et al., 2015).

A conversão de ácidos graxos não esterificados a ATP e acil-CoA ocorre no processo de beta-oxidação (em mitocôndrias e peroxissomos) ou ômega-oxidação (no retículo endoplasmático) em menor escala. Nela, os ácidos graxos não esterificados de cadeia curta e média passam pela membrana mitocondrial, enquanto que os de cadeia longa precisam ser marcados pela conversão a intermediários de acil-CoA primeiro (McGarry e Brown, 1997), enquanto que ácidos graxos de cadeia muito longa são oxidados no peroxissoma. A enzima carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1) promove o transporte de ácidos graxos de cadeia longa ativados para dentro da mitocôndria, esta etapa é limitante da velocidade da beta oxidação. A atividade da CPT1 é inibida pelo

conteúdo de malonil CoA (intermediário na lipogênese *de novo*) que se acumula em resposta a lipogênese induzida pela insulina (Zammit, 1999).

O estado nutricional e a demanda energética determinam diretamente ou indiretamente (por meio de flutuações hormonais) a expressão e atividade de fatores de transcrição e enzimas envolvidas na adipogênese, lipogênese e lipólise.

Metabolismo lipídico hepático e esteatose

Na obesidade, além do acúmulo de lipídios no tecido adiposo visceral e subcutâneo, também pode ocorrer acúmulo ectópico no fígado, músculo, pâncreas e rins, o que é denominado esteatose. Já foi demonstrado que o acúmulo ectópico de TG está relacionado com a resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia e hipertensão (Cohen et al., 2013; Pucci et al., 2013; Guebre-Egziabher et al., 2013; Byrne et al., 2013).

Um acúmulo de TG no fígado superior a 5% de seu peso caracteriza a esteatose hepática, e quando não associada ao elevado consumo de álcool é chamada de doença não alcoólica do fígado gorduroso (nonalcoholic fatty liver disease - NAFLD) (Trauner et al., 2010). Esta condição está associada a maior propensão ao desenvolvimento de esteatohepatite (esteatose e inflamação), fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (Rosselli e Lotersztajn, 2013). A incidência de NAFLD é de aproximadamente 50% entre diabéticos, 76% entre obesos e 100% entre indivíduos com obesidade mórbida (López-Velázquez et al., 2014).

A NAFLD pode ser causada por quatro fatores: (i) maior consumo de lipídios na dieta (15%), (ii) elevado influxo de ácidos graxos provenientes do tecido adiposo resistente ao efeito antilipolítico da insulina (60-80%), (iii) síntese hepática *de novo* de lipídios (25%) e (iv) redução da liberação de lipídios associados à lipoproteína de muito baixa densidade (Trauner et al., 2010).

Utilizando um modelo de hiperfagia espontânea com ratos OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty), Rector e colaboradores (2010) demonstraram que a NAFLD começa com disfunção mitocondrial, redução da beta-oxidação e aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). A NAFLD também está associada a resposta ao estresse no retículo endoplasmático (acúmulo de proteínas não dobradas ou mal dobradas no retículo endoplasmático), que resulta no aumento da síntese de proteínas pró-apoptóticas e pró-lipogênicas necessárias para o reparo de membranas

celulares, a SREBP-1c e o SREBP-2, desta forma contribuindo para a maior lipogênese hepática (Sozio et al., 2010).

Obesidade e o equilíbrio entre reações oxidativas e redutoras (balanço *redox*)

Reações de oxi-redução podem gerar radicais altamente instáveis que modificam moléculas próximas. Estas reações se processam normalmente, contribuindo com algumas funções fisiológicas, tais como sinalização celular, formação de hormônios como os tireoidianos, atividade de macrófagos, etc. Entretanto, em níveis elevados causam a perda da função de moléculas e, dependendo da magnitude do processo, pode causar doenças. Alterações no balanço redox da função mitocondrial e a ativação de enzima NADPH oxidase tipo 4 (envolvida na lipogênese) resultam na formação de EROs que estão envolvidas no desenvolvimento da resistência à insulina (Sies, 2015; Schrauwen-Hinderling et al., 2015). Além das EROs, também são formadas espécies reativas de nitrogênio (ERNs) a partir do óxido nítrico, sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase, e pelo radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) formado pela NADPH oxidase (Apel & Hirt, 2004).

Durante a oxidação de substratos metabólicos (glicose e de ácidos graxos) pelas células, são gerados cofatores enzimáticos, NADH e $FADH_2$, que transferem elétrons para a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CTEM) localizada na membrana mitocondrial interna. A medida que os elétrons são transferidos ao longo da CTEM para o oxigênio molecular, prótons são bombeados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, estabelecendo um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna. A energia deste gradiente de prótons é dirigida para a síntese de ATP pela ATP sintase à medida que os prótons são transportados de volta para a matriz mitocondrial (Mitchell, 1961). Em todas as células aeróbicas, a maior parte do oxigênio é reduzido a água na CTEM, mas uma parte significativa de moléculas de oxigênio não são completamente convertidas em H_2O , e formam o radical $O_2^{\bullet-}$, pelo vazamento de elétrons a partir dos complexos I e III da CTEM (Vernochet et al., 2014).

As espécies reativas de oxigênio ou EROS (radicais ânion superóxido, hidroxila, alcóxido) e de nitrogênio (radicais peróxido lipídicos, óxido nítrico e peroxinitrito) oxidam as moléculas presentes nas células causando modificações na estrutura e função de ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (Apel & Hirt, 2004). A degradação oxidativa de lipídios produz isoprostanos e aldeídos como o malondialdeído e 4-hidroxinonal. O dano oxidativo nas proteínas ocorre sobre os grupamentos tióis e pela carbonilação de

cadeias laterais, podendo resultar em perda de sua atividade. A oxidação sobre a guanosina do DNA gera o 8-hidroxideoxiguanosina e 7-hidroxi-8-oxo-20-deoxiguanosina, enquanto a oxidação sobre a uracila RNA, gera o 5-hidroximetil-20-deoxiuridina. Tais modificações causam a perda da função de lipídios e enzimas, o dano celular, provocam mutações e tumorigênese ou iniciam o processo de morte celular. (Sies, 2015).

As EROS podem ser neutralizadas por enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase dependente de manganês ou cobre e zinco (MnSOD e CuZnSOD, respectivamente) que convertem $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta molécula reativa é reduzida a H_2O na matriz mitocondrial pelos sistemas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) e tioredoxina/peroxiredoxina. O organismo também conta com antioxidantes não enzimáticos, como a albumina, glutathione, o ácido ascórbico, alfa-tocoferol, carotenóides e flavonóides. Estes são capazes de eliminar espécies de radicais ao doarem hidrogênio para reduzir o oxigênio singlete e o peróxido de hidrogênio; quelar o ferro, o que impede a reação de Fenton; e inibir enzimas oxidativas (Pisoschi & Pop, 2015). Além desse sistema antioxidante clássico, o desacoplamento mitocondrial da CTEM também reduz a formação de EROS, uma vez que aumenta a sua capacidade de transferência de elétrons da CTEM, restringindo o vazamento de elétrons pelos complexos e posterior produção de $O_2^{\bullet-}$.

Indivíduos obesos apresentam elevados níveis de ácidos graxos livres circulantes que aumentam a produção de EROs, e isto está relacionado ao processo de aterogênese (He & Zuo, 2015). Du et al (2013) demonstraram que o aumento da oxidação dos ácidos graxos livres em células endoteliais aumenta a produção de superóxido pela NADPH oxidase tipo 2 em camundongos com resistência à insulina. Neste mesmo estudo também foi observado que houve a ativação da sinalização pró-inflamatória e inibição da atividade de enzimas anti-aterogênicas. O estresse oxidativo sistêmico que acomete indivíduos obesos favorece o processo de disfunção endotelial contribuindo para as complicações cardiovasculares típicas da obesidade (Matsuda & Shimomura, 2013; He & Zuo, 2015). Também já foi demonstrado a associação entre aumento de estresse oxidativo no plasma e a esteatose hepática (Videla et al., 2004).

A obesidade está relacionada com o aumento da produção de EROs também no tecido adiposo. Já foi demonstrado que os ácidos graxos estimulam a expressão e atividade da NADPH-oxidase, a produção de ânions $O_2^{\bullet-}$ pela CTEM e diminuem a expressão das enzimas antioxidantes no tecido adiposo (Jankovic et al., 2015). O excesso de EROs provoca a redução da expressão da adipocina anti-inflamatória, a

adiponectina, o que favorece a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo, como o TNF α (Fernández-Sánchez et al., 2011). Esse aumento da produção de EROs também prejudica a sinalização da insulina, promovendo a ativação de enzimas que levam a fosforilação em serina/treonina do substrato do receptor de insulina (IRS), impedindo a expressão e translocação do GLUT4 (Bloch-Damti & Bashan, 2005). Assim, o desbalanço oxidativo no tecido adiposo permite um aumento dos níveis circulantes de ácidos graxos livres, reduz a contribuição do tecido adiposo para a normalização da glicemia pós-prandial e estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, favorecendo o estabelecimento de uma inflamação subclínica sistêmica.

O metabolismo hepático produz tanto as EROs quanto as ERNs, que em um indivíduo eutrófico e saudável são neutralizadas pelos mecanismos antioxidantes citados anteriormente. Entretanto, em indivíduos obesos, a produção EROS encontra-se aumentada e a sua neutralização está reduzida, favorecendo o dano oxidativo sobre as moléculas. No fígado, além da CTEM a atividade das monoxidases (P450 microsomal citocromo - CYP2E1, CYP4A10 e CYP4A14) e o estresse no retículo endoplasmático também geram EROs e ERNs (Leclercq et al., 2000). Em conjunto com o maior consumo de lipídios na dieta, o elevado influxo de ácidos graxos provenientes do tecido adiposo e a aumentada síntese hepática *de novo* de lipídios (Trauner et al., 2010), o estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de NAFLD (Videla et al., 2004, Rolo et al., 2012).

Regulação da adiposidade pelo sistema nervoso

O hipotálamo

O eixo hipotálamo-tecido adiposo controla a homeostase entre o consumo alimentar e o gasto energético, de forma a garantir um adequado aporte calórico para as atividades do organismo. O hipotálamo é composto por vários núcleos que produzem neuropeptídeos em resposta a estímulos hormonais, nutricionais e ambientais com a finalidade de manter a homeostase energética. O núcleo arqueado (ARC) integra informações periféricas hormonais (leptina, grelina e insulina) e nutricionais (glicose e ácidos graxos livres) (Wei et al., 2015). A leptina e a insulina atuam em seus receptores (ObR e IR, respectivamente) para reduzir a expressão e liberação dos peptídeos orexígenos, neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado a agouti (AgRP), e para estimular a expressão e liberação de peptídeos anorexígenos como o hormônio

estimulador de melanócitos α (α -MSH) ou melanocortina, que é derivado do pró-opiomelanocortina (POMC), e o transcrito regulado por anfetamina e cocaína (CART). O ARC emite projeções neuronais sobre outras áreas hipotalâmicas, como as áreas ventromedial (VMN), dorsomedial (DMN) e paraventricular (PVN) (Breton, 2013). O PVN participa da modulação do sistema nervoso autônomo simpático, mediando o gasto energético pela lipólise e termogênese do tecido adiposo.

O sistema dopaminérgico

A regulação do apetite também passa pela motivação para a alimentação relacionada com a sensação de recompensa, e responde às propriedades hedônicas de alimentos, tais como a sua visão, olfato, paladar e pode estar associada a sinais de condicionamento. O sistema mesocorticolímbico dopaminérgico regula comportamentos de motivação e emoção (Blum et al., 2014), tal como no vício por drogas (Van den Oever et al., 2012). Evidências recentes sugerem que o mesmo mecanismo que regula o vício em drogas regula também o consumo compulsivo de alimentos em obesos (Reichelt et al., 2015). Tanto indivíduos viciados em drogas quanto obesos possuem sensibilidade a dopamina alterada em regiões cerebrais, e essas mesmas áreas são ativadas tanto por drogas quanto por alimentos com alto teor lipídico e/ou glicídico (Van den Oever et al., 2012; Reichelt et al., 2015).

A obesidade é associada a alteração do comportamento alimentar, caracterizada pelo aumento do consumo calórico com preferência por alimentos palatáveis (Stice et al., 2013). O sistema mesocorticolímbico está envolvido no controle da escolha por alimentos palatáveis. Este sistema consiste na ativação de vias de sinalização dopaminérgicas que resultam na sensação de prazer e, em consequência, induzem a busca pela repetição do estímulo (Khanh et al., 2014). Açúcares e lipídios da dieta ativam neurônios da área ventral tegumentar (VTA) e estes liberam dopamina em suas terminações neuronais que inervam o núcleo accumbens (NAc). O NAc possui receptores de dopamina do tipo 1 e 2, e a ativação desses está relacionada com a sensação de prazer e recompensa (Khanh et al., 2014).

Além dos componentes palatáveis da dieta, hormônios como a leptina e a insulina também agem sobre a atividade dos neurônios dopaminérgicos inibindo sua atividade e consequentemente inibindo as sensações de prazer e recompensa (Lippert et al., 2014).

Os neurônios do NAc também possuem receptores de melanocortina do tipo 3 (MC3R). Esses neurônios recebem projeções do ARC que expressam POMC em resposta a sua ativação pela leptina (Simon et al., 2014). Assim, a resistência central a leptina que acomete indivíduos obesos está associada ao prejuízo da ação do sistema de recompensa, resultando no vício pela comida e preferência por comidas com alto teor de açúcar ou gorduras (Stice et al., 2013; Portella et al., 2015).

Sistema nervoso autônomo

A regulação da homeostasia é exercida pelo sistema nervoso e pelo sistema endócrino. O sistema nervoso pode ser dividido em somático e autônomo (visceral). O sistema somático está relacionado a ações voluntárias de motricidade, controle da musculatura esquelética, sinalização e recepção de informações da superfície corporal. O sistema nervoso autônomo (SNA) controla ações involuntárias de vasos sanguíneos, músculos lisos e cardíacos, vísceras e glândulas. Assim, o SNA promove a manutenção da homeostase interna ao comandar ações compensatórias em resposta a estímulos internos e externos, por exemplo, mantendo a temperatura corporal e o balanço hídrico (Sun, 1995).

O SNA é subdividido em parassimpático (SNP), simpático (SNS) e entérico. Regiões do córtex cerebral que controlam funções viscerais, compõem o nível mais elevado. Estas áreas enviam fibras nervosas ao hipotálamo. O hipotálamo é um centro de coordenação para o controle da atividade visceral, possui conexões nervosas e vasculares com a glândula hipófise e desta forma estimula a produção de hormônios hipofisários, regulando a função de outras glândulas. De outra forma, o hipotálamo envia fibras nervosas para centros do tronco cerebral responsáveis por funções mais específicas, como a regulação da respiração, a frequência cardíaca e circulação sanguínea. As fibras nervosas do SNA fazem sinapses em gânglios com outras fibras e estas inervam os órgãos alvos, sendo chamadas de fibras pré-ganglionares e fibras pós-ganglionares, respectivamente (Sun, 1995).

Um órgão pode ser inervado pelo SNS e SNP, e estes podem apresentar ações complementares ou opostas. O SNS é uma parte importante do mecanismo de reação ao estresse, regulação da termogênese corporal e pressão arterial. O SNS reúne fibras neuronais pré-ganglionares localizadas nos segmentos torácicos e lombares superiores da medula espinhal, saem pela raiz ventral e entram nos gânglios paravertebrais através de ramos comunicantes. Estas fibras pré-ganglionares liberam acetilcolina na fenda

sináptica de contato com as fibras pós-ganglionares. Essas fibras pós-ganglionares inervam os órgãos efetores onde liberam as catecolaminas, norepinefrina em maior quantidade e, em menor frequência, epinefrina (Amann & Constantinescu, 1990).

O SNP está relacionado com a regulação da digestão, metabolismo intermediário e excreção. Os neurônios pré-ganglionares estão localizados em vários núcleos de nervos cranianos no tronco encefálico, bem como na região intermediária dos segmentos S3 e S4 da medula espinhal sacral. Já os neurônios pós-ganglionares encontram-se localizados próximo ou mesmo nas paredes das vísceras torácicas, abdominais e pélvicas. Os neurônios pós-ganglionares parassimpáticos, que se projetam para as vísceras torácicas e de parte do abdômen, estão localizadas no núcleo motor dorsal do nervo vago e no núcleo ambíguo. Enquanto o núcleo motor dorsal do vago é amplamente secretomotor, o núcleo ambíguo é visceromotor. Também existem as fibras aferentes viscerais que trazem os estímulos originados da ativação dos receptores sensoriais de vísceras. A ativação destes receptores não chega ao nível da consciência, elas formam alças aferentes de arcos reflexos, fundamentais para a manutenção da homeostasia (Amann & Constantinescu, 1990).

A atividade do SNA pode ser avaliada por diferentes metodologias: determinação do conteúdo de norepinefrina tecidual e plasmático (Liatis et al., 2004), dosagem de metabólitos de catecolaminas na urina, quantificação do número de despolarizações de nervos específicos (Oliveira et al., 2011), canulação de regiões cerebrais para a administração de agentes estimuladores ou inibidoras da atividade autônoma (Hilzenderger et al., 2012), ensaios *in vitro* com administração de agonistas e antagonistas adrenérgicos em tecidos para avaliar a sua resposta sob a liberação de ácidos graxos ou glicose (Santos et al., 2012) ou aumento/redução de AMPc intracelular (Tholon et al., 2002), e ainda, avaliação da sensibilidade as catecolaminas através da quantificação de receptores adrenérgicos (Conceição et al., 2013).

Sistema nervoso autônomo (SNA) e metabolismo energético

O SNA inerva órgãos com importantes funções na regulação do metabolismo energético. Foi demonstrado que o aumento da atividade do SNS produz respostas catabólicas no metabolismo glicídico e lipídico, enquanto que a ativação do SNP produz respostas anabólicas. Especificamente, a atividade autônoma contribui para a regulação dos estoques energéticos por modular a liberação hepática de glicose, a secreção de

insulina e glucagon, a lipólise e a termogênese no tecido adiposo (Tentolouris et al., 2006; Geerling et al., 2014).

A produção hepática de glicose é induzida pelo glucagon e pelo SNS, via norepinefrina liberada pelas terminações nervosas que inervam o fígado e catecolaminas séricas (Yi et al., 2010; Sharabi et al., 2015). Shimazu et al. (1966) demonstraram que a ativação do hipotálamo ventromedial resulta no aumento da atividade simpática e na quebra do glicogênio hepático pelo aumento da atividade da enzima glicogênio fosforilase; enquanto que a estimulação do hipotálamo lateral aumenta a atividade parassimpática e eleva a síntese de glicogênio hepático. A estimulação elétrica do nervo esplênico é capaz de aumentar a atividade das enzimas glicogênio fosforilase e glicose-6-fosfatase reduzindo dessa forma os estoques de glicogênio hepático (Shimazu, 1996).

O SNA regula a função pancreática por meio de suas terminações nervosas próximas as ilhotas de Langerhans. Terminações parassimpáticas liberam acetilcolina, que potencializa a secreção de insulina induzida pela glicose, enquanto norepinefrina e epinefrina, liberadas pelas terminações simpáticas ou pelas células da medula suprarrenal, inibem a secreção de insulina e estimulam a secreção de glucagon (Ahren, 2000). Desta forma, indiretamente, através do estímulo a secreção de glucagon, o SNS estimula também a produção hepática de glicose. Da mesma forma que a ativação do SNP estimula a liberação de insulina, aumentando o efeito de inibição da glicogenólise hepática.

O TAB recebe inervações simpáticas de fibras noradrenérgicas. Estas se originam de neurônios pós-ganglionares oriundos de gânglios pré e paravertebrais. Os neurônios pós-ganglionares fazem sinapses colinérgicas com neurônios pré-ganglionares na porção intermediolateral da coluna vertebral (Slavin e Ballard, 1978). O SNS influencia o metabolismo do TAB pelas catecolaminas liberadas na corrente sanguínea pelas células cromafins da medula suprarrenal. Não há comprovação de que o TAB receba inervação parassimpática. As terminações nervosas simpáticas noradrenérgicas e as catecolaminas suprarrenais causam a ativação de receptores beta adrenérgicos que ativam a adenilato ciclase levando ao aumento da concentração de AMPc no citosol. Este AMPc ativa proteína cinase A, e esta fosforila e ativa a lipase hormônio sensível, enzima limitante do processo de lipólise. A ativação simpática do TAB também reduz a abundância da lipase lipoproteica de maneira pós-transcricional. Esta enzima limita a hidrólise de triglicerídeo do LDL circulante, inibindo a incorporação de triglicerídeo pelo TAB (Jocken et al., 2008a; Jocken et al., 2008b).

O TAM também tem seu funcionamento regulado pela atividade autônoma. Como antes mencionado, este tecido apresenta um importante papel na regulação da termogênese e peso corporal, por possuir uma alta quantidade de mitocôndrias e, conseqüentemente, alta capacidade de gasto energético. O peso do TAM e a atividade metabólica são inversamente relacionados com o índice de massa corporal e percentual de gordura corporal (Stephens et al., 2011), constituindo um importante foco para estudos relacionados ao tratamento da obesidade. Estudos com humanos e roedores mostram que o TAM é intensamente inervado pelo SNS, e a ativação deste estimula a lipólise e termogênese.

Sistema nervoso simpático (SNS) e obesidade

O SNS desempenha um papel essencial na regulação da homeostase metabólica e cardiovascular. A menor atividade do SNS pode ser considerada um fator de risco para o ganho de peso e desenvolvimento da obesidade. Entretanto, indivíduos obesos apresentam grande ativação do SNS, que coexiste com uma série de distúrbios endócrinos, metabólicos, renais e cardiovasculares (Smith e Minson, 2012). Estudos demonstram que a atividade simpática muscular é 50% maior em obesos (Alvarez et al., 2005) e que a deposição de gordura visceral, mais que a subcutânea, está relacionada com a hiperatividade simpática (Young e Macdonald, 1992). Este aumento da atividade simpática teria como objetivo aumentar a termogênese/lipólise, promovendo o gasto energético e assim reduzir os estoques de energia (Dulloo, 2002). Entretanto, a maior ativação de receptores beta-adrenérgicos devido a maior liberação de norepinefrina pelas terminações simpáticas, em longo prazo, causa a redução do número desses receptores, diminuindo assim a capacidade lipolítica do SNS sobre o tecido adiposo.

Entre as diferentes hipóteses apontadas como causa da hiperatividade simpática em obesos destaca-se a hiperinsulinemia compensatória decorrente da resistência periférica a este hormônio. A administração intracerebroventricular de insulina é capaz de aumentar a atividade simpática renal e no TAM (Morgan e Rahmouni, 2010), assim mesmo pacientes resistentes a insulina e com síndrome metabólica apresentam aumento da resposta simpática durante a hiperinsulinemia pós-prandial, caracterizando uma resistência seletiva a este hormônio (Straznicky et al. 2009).

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-córtex adrenal também leva ao aumento da atividade simpática. Injeções intracerebroventriculares de CRH aumentam a norepinefrina plasmática (Habib et al. 2000) e a atividade simpática nervosa renal

(Hilzendeger et al., 2012). Também, a hiperleptinemia comum em indivíduos obesos, contribui para a hiperativação do SNS. Hilzendeger et al. (2012) demonstraram que injeções intracerebroventriculares de leptina são capazes de aumentar a atividade simpática renal e no TAM em ratos não obesos. Entretanto, esse efeito não está relacionado com o efeito anorexígeno da leptina. Foi demonstrado que a ablação do receptor de insulina no órgão subfornical (região hipotalâmica), bloqueia a capacidade da leptina de aumentar a atividade simpática no TAM, sem alterar o consumo alimentar (Young et al., 2013).

Sistema simpatoadrenal

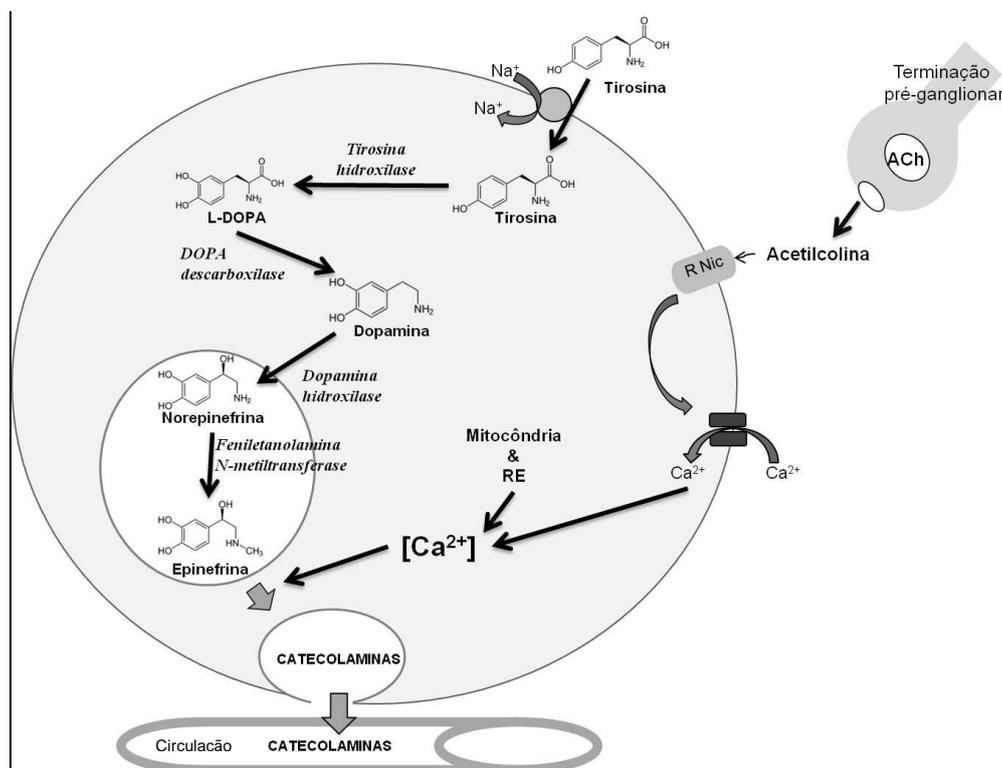
As células cromafins que compõem a porção medular da glândula adrenal constituem um gânglio simpático modificado por terem a mesma origem embrionária que o SNC, estando envolvidas nas respostas do organismo a situações de estresse. Tais situações desencadeiam a liberação de catecolaminas pela medula adrenal para a corrente sanguínea (de Diego, 2008), preparando o corpo para resposta de “luta ou fuga”. O aumento de catecolaminas para circulação aumenta a frequência e contração cardíaca e a pressão arterial, aumentando o fluxo de sangue para os músculos, preparando-o para a atividade intensa; além de aumentar o metabolismo celular e a dilatação das pupilas e bronquíolos (Hoffman & Taylor, 2001). Para suprir as demandas energéticas, a adrenalina estimula a glicogenólise e a gliconeogênese hepática, a glicogenólise muscular e a lipólise, aumenta a secreção de glucagon e inibe a secreção de insulina (Young, 2006; Teff, 2008; Jocken & Blaak, 2008a).

A regulação da liberação de catecolaminas pela medula adrenal envolve a percepção do estímulo agressor pelo SNC (hipotálamo lateral e ventromedial), que inicia o disparo de potencial de ação. Esse estímulo elétrico percorre a fibra esplênica até a terminação nervosa liberando acetilcolina nas fendas sinápticas, que é captada pelos receptores colinérgicos nicotínicos das células cromafins (Feldberg *et al.*, 1934; de Diego, 2008). A ativação do receptor causa a despolarização da membrana das células cromafins e, conseqüente, abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, resultando no aumento da concentração citosólica de Ca^{+2} e conseqüente exocitose das vesículas de catecolaminas (Douglas & Poisner 1961, 1962).

As catecolaminas são derivadas do aminoácido tirosina, que é gerado a partir da fenilalanina por ação da fenilalanina hidroxilase, ou obtido diretamente da dieta. Elas são constituídas por um grupo catecol (dihidroxibenzênio em posição *orto*) e um grupo

amina. Sua síntese tem início com a hidroxilação da tirosina pela enzima tirosina hidroxilase (TH), que forma a 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA). Esta é uma etapa limitante na biossíntese das catecolaminas, pois a TH é inibida por retroalimentação pelos compostos catecóis formados (Kuhar, 1999). A L-DOPA é descarboxilada pela enzima DOPA-descarboxilase (DOPA-d) no citosol, formando a dopamina. A dopamina é transportada ativamente para o interior de vesículas contendo a enzima dopamina β -hidroxilase ($D\beta H$), que catalisa a formação de noradrenalina ou norepinefrina (Kuhar, 1999). Na população de células cromafins produtoras de adrenalina, a enzima feniletanolamina N-metiltransferase (FNMT) catalisa a metilação da noradrenalina, formando adrenalina ou epinefrina (Kuhar, 1999). Os produtos dopamina, noradrenalina e adrenalina acumulam-se nas células cromafins até que seja deflagrado o estímulo a sua secreção (Figura 1).

Figura 1- Biossíntese de catecolaminas em células cromafins da adrenal.



Legenda: Biossíntese de catecolaminas em células cromafins da adrenal.
Fonte: Adaptado de Kuhar, 1999.

Após sua liberação na corrente sanguínea as catecolaminas possuem uma meia vida curta, pois são rapidamente metabolizadas por duas vias enzimáticas que envolvem a catecol orto metil transferase e a monoaminoxidase. Em seres humanos, a meia vida da adrenalina varia em torno de 20 minutos e da noradrenalina, 2 horas (Grouzmann *et al.*, 2001) e em roedores é de apenas 2 minutos (Rang *et al.*, 2004).

A síntese e secreção de catecolaminas podem ser moduladas por hormônios como os glicocorticoides (GC) e a leptina. A ativação do SNS pelo estresse é suprimida pelo bloqueio da liberação de CRH por dexametasona, demonstrando uma relação positiva entre GC e o sistema simpatoadrenal (Habib, 2000). Sabe-se que o córtex e a medula adrenal estão interligados por capilares com orientação centrípeta e as células cromafins possuem receptores para os GC. Os GC são capazes de exercer ações genômicas, e causam maturação das células cromafins, produção das catecolaminas, principalmente de adrenalina, ao estimular a transcrição de FNMT (Hodel, 2001). Os GC também exercem influência permissiva sobre a sensibilidade tecidual as catecolaminas, elevando a expressão de RNAm do receptor β -adrenérgico *in vivo* e *in vitro* (Ma, 2011).

As catecolaminas exercem seus efeitos sobre os tecidos mediante sua ligação a receptores ligados à proteína G. Existem dois tipos de receptores adrenérgicos: α -adrenérgicos (subtipos $\alpha 1$ e $\alpha 2$) e β -adrenérgicos (subtipos $\beta 1$, $\beta 2$, e $\beta 3$) (Quadro 1) (Barbe *et al.*, 1996; Dóda, 1996). Os receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos quando ativados se ligam a proteína G inibitória que inativa a adenilato ciclase, diminuindo a concentração de AMPc e reduzindo a ativação da proteína quinase A (PKA). A ligação das catecolaminas ao receptor β -adrenérgico ($\beta 2$ e $\beta 3$) resulta no acoplamento do receptor à proteína G estimulatória, que estimula a adenilato ciclase a produzir AMPc, que ativa a PKA. Esta fosforila a HSL e a perilipina (Granneman *et al.*, 2007). A fosforilação da perilipina (Ser492) favorece a associação da HSL fosforilada (Ser 659 e Ser660) à gotícula de gordura do adipócito (Lafontan e Langin, 2009; Brasaemle *et al.*, 2009). A LHS hidrolisa moléculas de triacilglicerol à diacilglicerol liberando ácido graxo (Jenkins-Kruchten *et al.*, 2003). Essa hidrólise constitui a etapa limitante da lipólise mediada por hormônios.

Quadro 1 - Característica dos receptores adrenérgicos

| Tecidos e efeitos | $\alpha 1$ | $\alpha 2$ | $\beta 1$ | $\beta 2$ | $\beta 3$ |
|-------------------------|---------------|-----------------------------------|-----------|--|-------------------------|
| Musculatura esquelética | | | | Tremor; \uparrow massa muscular e velocidade de contração; glicogenólise | Termogênese |
| Fígado | Glicogenólise | | | Glicogenólise | |
| Tecido adiposo | | \downarrow Lipólise | Lipólise | Lipólise | Lipólise Termogênese |
| Ilhotas pancreáticas | | \downarrow Secreção de insulina | | | |
| Terminações nervosas: | | | | | |
| Adrenérgicas | | \downarrow Liberação | | \uparrow Liberação | |
| Colinérgicas | | \downarrow Liberação | | | |

Fonte: Adaptado de Rang *et al.*, 2004, p. 185; Tentolouris *et al.*, 2008.

Sistema simpatoadrenal e distúrbios cardiometabólicos

O SNS está relacionado com a regulação do gasto energético e mobilização de gordura, ao estimular a termogênese, a glicogenólise e a lipólise (Spraul, 1993), assumindo desta forma, grande importância na fisiopatologia da obesidade. De fato, há décadas têm-se demonstrado a contribuição do SNA para o desenvolvimento da obesidade (Bray *et al.*, 1981; Scheurink *et al.*, 1996), que se caracteriza pela redução da atividade simpática e aumento da atividade parassimpática (Young & McDonald, 1992). No modelo de obesidade hipotalâmica induzida pela administração neonatal de glutamato monossódico em camundongos, que causa lesões no núcleo arqueado e na eminência mediana (Olney, 1969), foi demonstrado redução da expressão de TH e D β H, e menor conteúdo de catecolaminas adrenais e de sua secreção estimulada por potássio aos 90 dias de idade (Martins *et al.*, 2004). Tais resultados refletem uma disfunção adrenomedular na idade adulta que contribui para o aumento dos estoques de gordura.

O aumento da atividade simpática está associado ao desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares (Morris, 2008), que são normalizados pela redução do peso corporal (Poirier *et al.*, 2006; Batsis *et al.*, 2007). Sendo assim, diferentes estudos consideram a participação de parâmetros alterados pela obesidade na gênese de doenças cardiovasculares, como por exemplo: a hiperatividade do sistema simpatoadrenal e do sistema renina-angiotensina, a ausência de resposta a agentes vasodilatadores, a

hipersensibilidade a vasoconstrictores, o estado pró-inflamatório sistêmico, a hiperinsulinemia e a hiperleptinemia (Hall *et al.*, 2001; Poirier *et al.*, 2006).

O SNS pode ser modulado de acordo com a oferta energética, na qual o estado alimentado promove a sua ativação, enquanto a restrição alimentar inibe sua atividade (Gentile *et al.*, 2007). Isso ocorre, possivelmente, pelo estímulo ao aumento da concentração sérica de leptina e insulina no estado alimentado (Rayner & Trayhurn, 2001). Este mecanismo de alguma forma preserva a massa de tecido adiposo, pois no excesso alimentar ativa o processo de gasto energético, enquanto que na restrição reduz a ativação simpática. Entretanto, nos estados de jejum prolongado ocorre maior ativação simpática, em especial da medula adrenal.

Estudos que investigam a relação entre a leptinemia e distúrbios cardiovasculares indicam que a hiperleptinemia está associada com a ocorrência de infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico em seres humanos, independente da presença de outros fatores de risco para doenças cardiovasculares (Rayner & Trayhurn, 2001; Zhang *et al.*, 2011; Sierra-Johnson *et al.*, 2007). A atividade simpática a nível hipotalâmico é inibida em escala proporcional a expressão de NPY no núcleo do trato solitário (Morris *et al.*, 1997). Uma possível explicação para a associação entre a hiperleptinemia e o maior risco cardiovascular é sua capacidade de suprimir a expressão de NPY e conseqüentemente aumentar a atividade simpática (Baltatzi *et al.*, 2008). Assim, a hiperatividade do sistema simpatoadrenal resulta na elevação da pressão arterial, da frequência cardíaca, da concentração sérica de glicose e de ácidos graxos livres e glicerol, todos fatores que contribuem para maior risco cardiovascular. A leptina também estimula a expressão de α -MSH, que por sua vez, estimula a atividade simpática ao se ligar aos receptores MC4R (*melanocortin 4 receptor*), aumentando a pressão arterial (Ni *et al.*, 2006). Tal efeito ocorre independente da resistência ao efeito anorexigênico da leptina, sugerindo uma sensibilidade seletiva a leptina nos núcleos hipotalâmicos (Kalil & Haynes, 2012).

A hiperinsulinemia associada à obesidade estimula a atividade do SNS (Grassi, 2010). Muntzel *et al.*, (1994) ao administrar insulina no terceiro ventrículo de ratos Wistar constatou a elevação da atividade simpática muscular, porém este tratamento não foi capaz de estimular a atividade simpatoadrenal, as concentrações plasmáticas de glicose e insulina, a pressão sanguínea e a frequência cardíaca, evidenciando uma independência entre a ativação do SNS e do sistema simpatoadrenal.

Quanto a atividade simpatoadrenal sobre o metabolismo energético, estudos apontam uma interação entre hormônios que se apresentam geralmente alterados na

obesidade e atividade do sistema simpatoadrenal (Aiston *et al.*, 1999). Estudos *in vivo* sugerem que a hiperleptinemia em obesos atua como supressor da glicogenólise hepática pela redução da sensibilidade a glicogenólise mediada pela adrenalina (Nemecz *et al.*, 1999). Desta forma, a leptina age como um hipoglicemiante ao impedir a degradação do estoque hepático de glicogênio. Entretanto, a administração intracerebroventricular de leptina reduz o conteúdo hepático de glicogênio (Takahashi *et al.*, 1997). Possivelmente isto decorre da ação da leptina sobre o núcleo hipotalâmico ventromedial, que aumenta a atividade simpática no fígado. Nosso grupo demonstrou que a hiperleptinemia neonatal é capaz de causar hiperleptinemia, resistência hipotalâmica a leptina e maior glicogênio hepático nos ratos aos 150 dias de vida (Trevenzoli *et al.*, 2010b), confirmando os achados de Nemecz *et al.*, (1999) em humanos obesos. Em conjunto tais resultados reforçam a independência entre a ativação do SNS e do sistema simpatoadrenal, bem como sua importância para a homeostase glicêmica e a interação entre hormônios sensores do estado nutricional.

Obesidade e Vitamina D

Classicamente a vitamina D desempenha importante papel na regulação do metabolismo ósseo, estimulando a absorção intestinal do cálcio da dieta e aumentando a reabsorção renal de cálcio (Bikle, 2014). Mais recentemente, a vitamina D também tem apresentado funções sobre o sistema imune, cardiovascular e renal, entre outras (Lips, 2006). Desta forma, o reconhecimento da importância da vitamina D na homeostase energética despertou um grande interesse na comunidade científica nas últimas décadas sobre seus aspectos moleculares e seu impacto sobre distúrbios endócrinos. No entanto, enquanto alguns trabalhos apontam que aumento dos níveis séricos ou da sensibilidade tecidual a vitamina D atuem como fator de risco para obesidade (Shi *et al.*, 2001; Zemel, 2002), outros correlacionam a sua deficiência como causa da obesidade (Mezza *et al.*, 2012; Vanlint, 2013; Grineva *et al.*, 2013), sendo portanto ainda controverso a relação entre obesidade e vitamina D.

Uma das hipóteses seria um possível efeito pró-lipogênico da vitamina D estimulando o influxo de cálcio para o citoplasma, o que ativaria vias dependentes de cálcio promovendo a lipogênese e inibindo a lipólise (Zemel, 2002). Zemel *et al.* (2000) demonstraram que o tratamento de adipócitos humanos com vitamina D é capaz de aumentar a concentração de cálcio intracelular, e esse aumento contribuiu para a ativação da enzima FAS e inibiu a lipólise de maneira dose dependente. Assim, um

baixo consumo de cálcio na dieta, levaria a hipocalcemia, ao aumento da vitamina D e consequente a obesidade. Por outro lado, outros estudos relacionam a deficiência de vitamina D com o desenvolvimento da obesidade (Wortsman et al. 2000; Ardawi et al. 2011; Grant et al. 2014; Wong et al. 2009; Kong et al. 2006).

Nosso laboratório vem estudando alterações do status da vitamina D no desenvolvimento da obesidade em modelos de programação metabólica, bem como o efeito da suplementação dietética com cálcio na obesidade e distúrbios relacionados, pois se sabe que uma dieta rica em cálcio é capaz de reduzir a adiposidade (Zemel e Miller, 2004). Nobre et al., (2011) verificaram que a obesidade causada pela administração de nicotina na lactação está relacionada com maior concentração sérica de vitamina D total e que a suplementação com carbonato de cálcio na dieta (CaCO_3 , 10g/kg de ração) é capaz de reverter a obesidade, melhorar o perfil lipídico e normalizar a vitamina D total. Em outro trabalho de Nobre et al (2012) com animais adultos obesos que sofreram desnutrição ao final da lactação causada pelo desmame precoce, o mesmo padrão foi observado: maior concentração de vitamina D total sérica e a suplementação com cálcio também foi capaz de normalizar a adiposidade visceral, perfil lipídico e normalizar a concentração sérica de vitamina D total.

Nimitphong et al. (2012) utilizando pré-adipócitos e adipócitos humanos demonstraram a presença do receptor de vitamina D (VDR), bem como ativação do receptor pela administração de pré-vitamina D (em maiores concentrações) e principalmente por vitamina D, resultando no aumento da expressão de $\text{PPAR}\gamma$, diferenciação de pré-adipócitos e aumento do conteúdo de triglicérido. A utilização de uma dieta rica em cálcio seria capaz de reduzir a vitamina D e consequentemente reduzir a adiposidade.

De forma indireta, a vitamina D, aumenta os estoques energéticos ao modular a ativação de glicocorticóides no tecido adiposo. A vitamina D aumenta a expressão da enzima 11β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 (11β -HSD 1) em adipócitos humanos, ativando a conversão de cortisona a cortisol, que tem ação pró-adipogênica (Morris & Zemel, 2005).

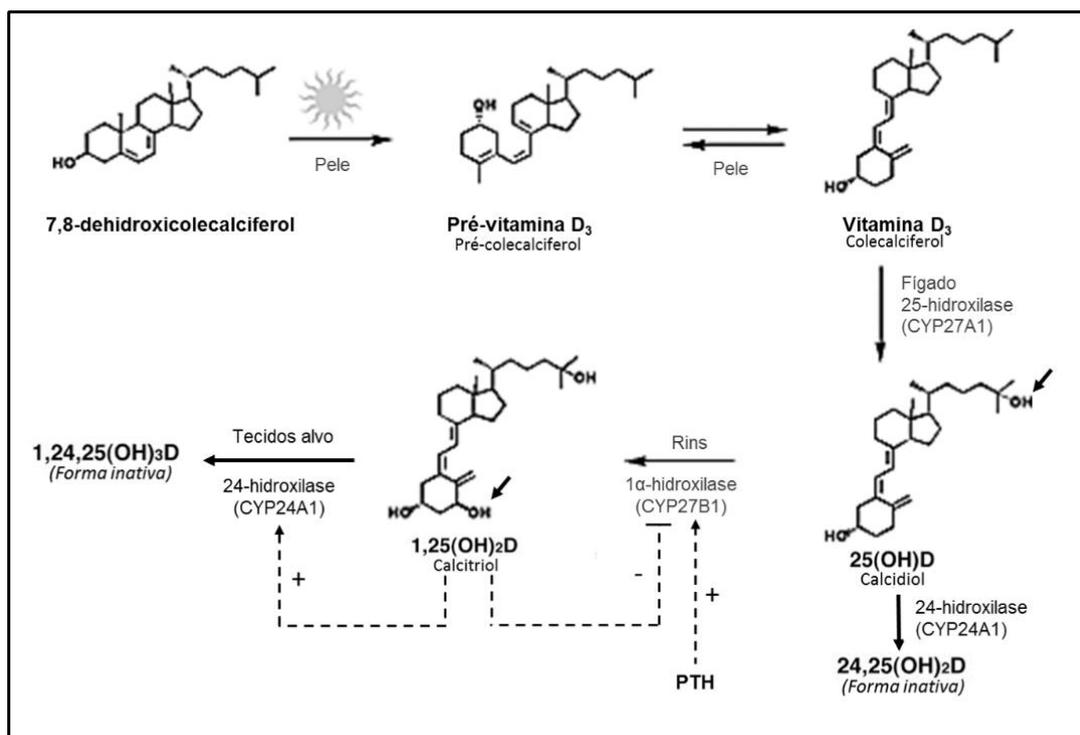
Por outro lado, Malloy e Feldman (2013) utilizando modelo de cultura de células humanas de TAM demonstraram que o VDR sem o seu ligante (vitamina D) é capaz de inibir a expressão de UCP1 e da UCP2 no TAB, uma proteína que desacopla a oxidação de ácidos graxos da produção de ATP e produz calor, assim reduzindo a capacidade termogênica do tecido adiposo e favorecendo a redução do gasto energético. Esse

achado sugere uma redução da termogênese em uma situação de deficiência de vitamina D.

Como antes mencionado, a redução de vitamina D também está relacionada com uma alta adiposidade corporal (Vanlint, 2013; Clare Grace et al., 2014). A menor exposição solar causa sua menor ativação e/ou aumento do catabolismo e sequestro pelo tecido adiposo (Pilz et al., 2012). Rosenstreich et al. (1971) demonstram que a vitamina D é mantida em concentração elevada no tecido adiposo, devido à sua característica lipofílica, resultando em baixo nível sérico, tal como em obesos, uma vez que estes possuem maior razão massa gorda/massa magra. O sequestro de vitamina D pode ter um impacto sobre o metabolismo do tecido adiposo, uma vez que os adipócitos expressam 1α -hidroxilase, a enzima que ativa a pré-vitamina D em vitamina D, e o VDR (Omdahl et al., 2002).

Não apenas os níveis séricos da vitamina D devem ser considerados na avaliação do seu impacto sobre os tecidos. Uma metabolização ou ação alterada da vitamina D no tecido adiposo de obesos, pode agravar o quadro de obesidade (Stein et al., 2009; Earthman et al., 2012). Wamberg et al. (2013) comprovaram a redução da expressão das enzimas 25-hidroxilase e 1α hidroxilase com níveis normais de 24-hidroxilase no tecido adiposo subcutâneo de mulheres obesas. Embora neste estudo, a 24 hidroxilase não esteja alterada, deve-se considerar que o maior volume do tecido adiposo subcutâneo em mulheres obesas poderia contribuir para inativação da vitamina D.

Figura 2 - Ativação e inativação da vitamina D.



Legenda: Biossíntese da vitamina D.

Fonte: Adaptado de Lips, 2006

Ainda no contexto de síndrome metabólica, estudos epidemiológicos correlacionam à deficiência da vitamina D com o desenvolvimento da esteatose hepática de causa não alcoólica (Barchetta et al., 2011; Bhatt et al., 2013). Na deficiência de vitamina D, a lipogênese, a adipogênese e a capacidade de armazenamento de lipídios estariam reduzidas no adipócito (Nimitphong et al., 2012). A resistência a insulina no tecido adiposo causada pelo excesso de glicocorticoides, pelo estresse oxidativo e possivelmente pela deficiência de vitamina D (Santos e Vianna, 2005), permite a liberação de elevadas quantidades de ácidos graxos livres que são direcionados para o fígado (Chang et al., 2009). Também já foi comprovada a ação imunomoduladora da vitamina D sobre hepatócitos e fibroblastos. Com o uso de uma dieta hipercalórica e restrita em vitamina D, Roth et al. (2012) demonstraram a associação entre a NAFLD e o aumento da expressão de interleucina-4, interleucina-6 e TNF-alfa em hepatócitos. A vitamina D inibe a proliferação e a produção de colágeno de fibroblastos (Potter et al., 2013). Desta forma, sua redução no soro está associada a severidade da doença hepática na síndrome metabólica.

Recentemente, Nobre e colaboradores (2016) mostraram no modelo de desmame precoce que estes animais com sobrepeso, apresentavam maior vitamina D sérica, maior

1-alfa hidroxilase no adipócito, sugerindo um maior conteúdo da 1-25(OH)₂ vitamina D no adipócito, porém com menor VDR. Assim, sugere-se que tanto a deficiência de vitamina D pode provocar obesidade por deixar VDR não ligado atuar como obesogênico, por menor termogênese no adipócito (Malloy & Feldman, 2013), quanto o excesso de vitamina D ativa no adipócito reduzindo sua ação intracelular por diminuição de VDR (Nobre et al. 2016).

Frente a esses diferentes achados relacionando alterações no status da vitamina D (metabolismo e ação), cada vez mais torna-se importante o desenvolvimento de estudos para desvendar a evolução da obesidade associada a disfunções na produção e ação da vitamina D.

Programação metabólica ou plasticidade ontogenética

Estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais evidenciam uma relação entre a influência de fatores nutricionais (Reynolds et al., 2015; Conceição et al., 2013; Alfaradhi & Ozanne, 2011; Symonds *et al.*, 2009), hormonais (Trevenzoli *et al.*, 2010a, 2010b; Ellis et al., 2014) e ambientais (Oliveira *et al.*, 2010; Vaiserman, 2015; Wright & Brunst, 2013) na gestação e/ou lactação e a suscetibilidade ao desenvolvimento da obesidade na puberdade e idade adulta. A fase do desenvolvimento em que tais influências ocorrem é de extrema importância, pois são em janelas específicas que são definidos padrões epigenéticos de expressão gênica, que em sua maioria poderão permanecer por toda vida (Valenzuela et al., 2015; Tain *et al.*, 2015; Plagemann *et al.*, 2010). A princípio, isto tornaria o indivíduo melhor adaptado a determinada condição desfavorável a que foi exposto no início da vida. No entanto, caso o indivíduo seja exposto a um ambiente diferente, ele estará mais suscetível ao desenvolvimento de doenças (Barker, 2004; de Moura *et al.*, 2008). A este fenômeno foi atribuído o nome de *programação metabólica* (Lucas, 1991; Barker, 2005) ou mais recentemente *plasticidade ontogenética* (Gluckman & Hanson, 2007), por sua característica mais probabilística do que determinística.

Nosso grupo tem se dedicado a investigar os desdobramentos de diferentes fatores ocorridos especificamente durante a lactação e suas repercussões na idade adulta. De uma forma geral, em diversos modelos experimentais de programação na lactação demonstramos que fatores como a escassez de nutrientes (Passos et al, 2000, Bonomo et al, 2007; Lima et al., 2011) e a hiperleptinemia (Toste et al, 2006; Trevenzoli et al, 2007, Trevenzoli et al., 2010) podem atuar como fatores de *imprinting*

determinantes para disfunções metabólicas futuras, que podem envolver em modificações no padrão de expressão gênica de fatores reguladores do metabolismo energético.

Mais recentemente, nosso grupo tem estudado estratégias de reversão ou prevenção dos distúrbios metabólicos decorrentes de manipulações durante a lactação. No modelo de desmame precoce, Nobre et al., (2012) ao utilizar uma dieta suplementada com cálcio (10g de CaCO_3 /kg de ração comercial) do 120º ao 180º dia de vida obteve sucesso na correção da maior adiposidade, hiperleptinemia, sensibilidade a insulina e a leptina, e melhora do perfil lipídico. A suplementação com cálcio também foi eficaz em reverter a adiposidade, a hiperleptinemia, a sensibilidade a leptina e insulina hipotalâmica, bem como aumentar a expressão da sirtuina 1 hepática em ratos obesos na vida adulta, que foram programados pela exposição materna a nicotina na lactação (Nobre et al, 2011).

Modelo de obesidade programada pela superalimentação neonatal

Diversos estudos utilizam a superalimentação neonatal como modelo experimental de obesidade (Plagemann *et al.*, 1999a, 1999b; Boullu-ciocca *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2011; Plagemann *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2012; Conceição *et al.*, 2011, 20013a, 2013b, 2015; Bei et al., 2015). A superalimentação pós-natal induzida pela redução do tamanho da ninhada no terceiro dia resulta em obesidade da prole lactente devido à maior oferta de leite materno aos filhotes e elevação do conteúdo de triglicerídeo no leite (Velkoska *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2009).

A redução da ninhada resulta em hiperfagia, hiperleptinemia, hiperinsulinemia, hiperglicemia, resistência hipotalâmica a insulina e a leptina, e maior adiposidade visceral já ao desmame (Plagemann *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2011; Conceição *et al.*, 2011). Durante a lactação, estruturas hipotalâmicas que controlam o consumo alimentar e gasto energético, encontram-se em formação e são altamente vulneráveis à ação de hormônios neurotróficos, que podem conduzir a desorganização estrutural e consequente disfunção dos núcleos hipotalâmicos que regulam peso corporal e consumo alimentar (Plagemann *et al.*, 1999a e 1999b; Bouret et al., 2004; Pinto et al., 2004; Bouret & Simerly, 2006; Bouret *et al.*, 2010).

Esta disfunção se caracteriza pela redução do efeito inibitório da leptina sobre neurônios relacionados à regulação do apetite no núcleo arqueado dos ratos adultos

jovens, aos 50 dias de vida (Davidowa & Plagemann, 2000 e 2001). Adicionalmente os neurônios do núcleo ventromedial apresentam resposta aumentada aos peptídeos orexígenos NPY (*neuropeptídeo Y*) e AgRP (*agouti-related protein*) e reduzida aos anorexígenos α -MSH (*α -melanocyte-stimulating hormone*) e o CART (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide*) (Heidel *et al.*, 1999; Davidowa *et al.*, 2002, 2003; Li *et al.*, 2002).

No modelo de supernutrição também é descrita menor sensibilidade central a leptina aos 180 dias, caracterizado pela redução do conteúdo hipotalâmico de JAK2 (*janus kinase 2*) e STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) fosforiladas, e aumento do conteúdo de SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), que é uma proteína estimulada pela leptina, mas que inibe a sinalização deste hormônio através da desfosforilação da JAK2 (Rodrigues *et al.*, 2011). A leptina é uma adipocina que promove inibição dos neurônios orexígenos produtores de NPY/AgRP e ativação dos neurônios anorexígenos produtores de α -MSH/CART do núcleo arqueado do hipotálamo, conseqüentemente causando a ativação dos neurônios do núcleo paraventricular produtores de CRH (*corticotropin-releasing hormone*) e TRH (*thyrotropin-releasing hormone*) (Pekary, 2010), além de aumentar o gasto energético (Villanueva, 2008).

Ratos superalimentados são hiperinsulinêmicos ao desmame (Rodrigues *et al.*, 2011). Este hormônio pode alterar epigeneticamente a expressão gênica (Langley-Evans, 2015). Recentemente Portella e colaboradores (2015) demonstraram que ratos superalimentados com 60 dias de vida, tem o VTA mais sensível a insulina e com alta produção de dopamina, porém o NAc tem menor sensibilidade a dopamina, pela redução do receptor de dopamina tipo 2. Esses ratos comem mais ração hiperglicídica em resposta a um estímulo estressante. A redução da sensibilidade a dopamina, tornam esses ratos propensos ao desenvolvimento de vício por comidas palatáveis, típico da obesidade.

Além da resistência hipotalâmica a insulina (Plagemann *et al.*, 1999), os animais submetidos à superalimentação pós-natal apresentam menor sensibilidade a insulina no tecido adiposo epididimal aos 90 dias (Rodrigues *et al.*, 2007) e no coração aos 140 dias de idade (Martins *et al.*, 2008). De fato, foi observado hipermetilação da região promotora do gene do receptor de insulina no hipotálamo aos 21 dias, que pode explicar a sua menor expressão e conseqüente resistência insulínica (Plagemann *et al.*, 2010) ao longo do desenvolvimento. Apesar da menor sensibilidade a insulina detectada em alguns tecidos, já foi demonstrado que a superalimentação neonatal resulta em

hiperinsulinemia e aumento da sensibilidade a insulina no coração ao desmame (Pereira *et al.*, 2006) e nas células- β pancreáticas aos 360 dias de idade (Cunha *et al.*, 2009), ajudando a explicar a própria hiperinsulinemia. Neste modelo, nosso grupo evidenciou resistência a insulina no fígado associada a estresse oxidativo e microesteatose aos 180 dias de vida (Conceição *et al.*, 2013).

A redução de ninhada leva a hipertensão arterial em roedores aos 112 dias de vida (Morris *et al.*, 2005). Este achado pode se dever ao aumento da leptinemia, pois a administração intracerebroventricular de leptina aumenta a liberação de catecolaminas adrenais e o tônus vasomotor (Marsh *et al.*, 2003). A redução de NPY apresentada neste modelo aos 180 dias (Rodrigues *et al.*, 2011) e pode favorecer o aumento da atividade simpática (Egawa *et al.*, 1991).

Heggeness *et al.* (1970) identificaram maior conteúdo de noradrenalina no coração em ratos superalimentados aos 15 dias de vida, porém não ao desmame. Como os sistemas neuroendócrinos se encontram em formação durante os primeiros 15 dias de vida em roedores, possivelmente o excesso de nutrientes estimule o SNS. Outro estudo, mostrou maior conteúdo de adrenalina no TAM de ratos criados em ninhada pequena ao desmame (Young, 2002). É interessante ressaltar que a maior atividade do SNS verificada nessa idade coexiste com a obesidade (Heggeness *et al.*, 1970; Young, 2002).

Entretanto, Young (2002) mostrou que roedores superalimentados possuem menor geração de noradrenalina estimulada por sacarose no TAM, coração e rins aos 65 dias de vida, o que sugere menor atividade simpática periférica. Assim, ao contrário do que ocorre no início da vida, os animais submetidos à superalimentação neonatal apresentam menor atividade do SNS, basal e estimulada pela glicose, contribuindo para manutenção da obesidade. De Almeida *et al.* (2013) mostraram redução da termogênese no TAM, durante o dia e a noite, porém sem alteração da atividade simpática em animais superalimentados aos 90 dias de vida. Neste trabalho também foi verificada a maior atividade parassimpática, pela maior taxa de despolarização do nervo vago (de Almeida *et al.* 2013), contribuindo para maior secreção de insulina observada no modelo (Shimazu, 1996). É curioso, que este modelo de obesidade experimental está associado a diminuição da atividade simpática, enquanto outros modelos, principalmente quando iniciados no animal adulto, levam a aumento da atividade simpática. Também, estes estudos com superalimentados foram realizados com animais relativamente jovens, sendo importante avaliar a evolução do sistema simpático no decorrer da vida, em especial em idades mais avançadas, onde as co-morbidades da obesidade começam a aparecer.

Crianças obesas apresentam redução a sensibilidade lipolítica mediada pelas catecolaminas (Bougnères *et al.*, 1997; Enoksson *et al.*, 2000) e o emagrecimento não é capaz de melhorar a sensibilidade as catecolaminas no tecido adiposo (Blaak *et al.*, 1994). Isto sugere que a resistência a lipólise possa ser uma das alterações iniciais para o estabelecimento da obesidade. Portanto o modelo de redução de ninhada auxilia a compreender os desdobramentos da obesidade precoce sobre a função simpatoadrenal, e assim identificar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, além de desenvolver medidas terapêuticas para as alterações simpatoadrenais relacionadas com a obesidade (Young, 2002; Martins *et al.*, 2004).

Lau *et al.* (1988) identificaram aumento da atividade das enzimas TH e FNMT nas células cromafins de ratos superalimentados somente na lactação. Esse aumento pode ser atribuído a maior concentração de GC destes animais, uma vez que os GC aumentam a síntese de catecolaminas ao estimular a expressão de FNMT (Hodel, 2001).

Além das alterações simpatoadrenais relacionadas à produção e secreção das catecolaminas, os tecidos alvos podem ainda apresentar reduzida sensibilidade a estes hormônios (Wang *et al.*, 2001; Haemmerle *et al.*, 2004). Estudos *in vivo* demonstram que indivíduos obesos apresentam redução da sensibilidade ao efeito lipolítico das catecolaminas no adiposo subcutâneo abdominal (Schiffelers *et al.*, 2003; Jocken *et al.*, 2008) possivelmente associada à ineficiência dos mecanismos lipolíticos intracelulares acionados pelas catecolaminas (Jocken e Blaak, 2008).

Quanto ao status da vitamina D no modelo de redução de ninhada, De Albuquerque Maia *et al.* (2014), não encontraram alteração da concentração sérica de vitamina D na vida adulta. Entretanto pouco se sabe sobre a contribuição da vitamina D sobre parâmetros do metabolismo energético neste modelo experimental.

Justificativa do estudo

Nosso grupo busca ampliar o conhecimento sobre os prováveis distúrbios neuroendócrinos e metabólicos que podem contribuir para o desenvolvimento da síndrome metabólica no modelo experimental de obesidade neonatal, que mimetiza um importante subgrupo de indivíduos obesos, uma vez que a incidência de obesidade infantil é crescente. Portanto, torna-se importante caracterizar as diferentes alterações associadas a este modelo e que podem ser tanto causa como consequência da obesidade. A superalimentação neonatal causada pela redução do tamanho da ninhada leva ao desenvolvimento de hiperfagia e obesidade ao longo da vida, possivelmente por

aumento da adipogênese e inibição da termogênese. Entre outros distúrbios metabólicos encontrados na idade adulta neste modelo, destacamos a disfunção hepática, caracterizada por estresse oxidativo e esteatose. Assim, os seguintes questionamentos nortearam esta Tese: A superalimentação precoce seria capaz de induzir danos oxidativos nos animais já ao desmame? O aumento da adiposidade abdominal nos animais adultos estaria relacionado com o efeito diferencial sobre a adipogênese de hormônios, como a vitamina D e os glicocorticóides, no tecido adiposo visceral ou a menor capacidade termogênica do tecido adiposo marrom? Visto que estes animais são hiperfágicos mesmo com uma dieta padrão, será que quando desafiados com comidas palatáveis eles podem apresentar vício alimentar por açúcar ou gordura? Será que a via dopaminérgica de recompensa cerebral foi programada pela superalimentação no início da vida?

Considerando as repercussões da obesidade, o possível uso de fatores nutricionais que visam tratar, melhorar ou prevenir as desordens metabólicas relacionadas a obesidade torna-se muito interessante. Desta forma, estudamos o efeito da terapia nutricional com cálcio por dois meses sobre: adiposidade, disfunção hepática, metabolismo e ação da vitamina D e de glicocorticóides no adipócito, atividade autônoma simpática, sistema dopaminérgico de animais obesos adultos que foram criados em ninhadas pequenas.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Investigar a repercussão da obesidade programada pela superalimentação pós-natal, bem como o efeito da suplementação com uma dieta rica em cálcio por dois meses, sobre a gordura visceral, dano oxidativo, esteatose, metabolismo e ação da vitamina D e de glicocorticóides no adipócito, atividade autônoma simpática e sistema dopaminérgico.

1.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar se a superalimentação pós-natal é capaz de provocar, já ao desmame, o acúmulo de gordura e estresse oxidativo em fígado e adipócitos. Caracterizar a expressão de proteínas adipogênicas e lipogênicas no tecido adiposo branco visceral e/ou fígado, bem como a atividade simpática e simpatoadrenal.
- b. Avaliar se uma suplementação dietética com carbonato de cálcio (CaCO_3) de PN120 a PN180 é capaz de melhorar os indicadores de dano oxidativo hepático e esteatose no modelo de redução de ninhada.
- c. Avaliar se a superalimentação pós-natal leva a alteração do metabolismo e/ou ação da vitamina D e do glicocorticóide no tecido adiposo visceral que explique o maior acúmulo de gordura. Determinar se uma dieta enriquecida com cálcio reduz a adiposidade pela modulação da ação desses dois hormônios do adipócito.
- d. Avaliar se a superalimentação no início da vida afeta: parâmetros cardiovasculares, atividade autonômica simpática do tecido adiposo marrom (TAM), morfologia do TAM, sensibilidade a catecolaminas e hormônios tireoidianos no TAM, função simpatoadrenal e conteúdo de POMC e MC4R o hipotálamo. Estudar se a suplementação com cálcio influencia estes parâmetros.

- e. Avaliar se hiperfagia dos animais que foram superalimentados na lactação está associada a preferência por dieta rica em açúcar ou gordura e, conseqüentemente, a alterações do sistema de recompensa dopaminérgico mesocorticolímbico. Adicionalmente, investigar se o cálcio na dieta reduz o consumo alimentar, altera a preferência por alimentos palatáveis e modula a via dopaminérgica mesocorticolímbica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Modelo experimental

O desenho experimental descrito neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia da UERJ (CCEUA/012/2014), estando de acordo com a Lei n°. 11.794 sancionada em 2008 (Marques *et al.*, 2009).

Para o desenvolvimento do nosso estudo, utilizamos 20 ratas Wistar (3 meses), nulíparas, mantidas em biotério com temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro (7:00-19:00 h) controlados que foram acasaladas (2 fêmeas:1 macho) e receberam água e ração *ad libitum*. As fêmeas grávidas foram então colocadas em gaiolas individuais, nas quais permaneceram até o desmame junto com sua prole.

Para desenvolver nosso modelo experimental de obesidade (Figura 3), ao nascimento, as proles foram aleatoriamente, divididas em dois grupos:

- Grupo controle (NL): Cada fêmea lactante teve o tamanho de sua ninhada ajustada para 10 filhotes (n=10 ninhadas).

- Grupo superalimentado (SL): Cada fêmea lactante teve o tamanho de sua ninhada ajustada para 10 filhotes até o terceiro dia de vida. Neste dia o tamanho da ninhada foi ajustado para 3 filhotes machos por fêmea lactante (n=10 ninhadas).

Do 21° até 120° dia de idade, ambas as proles tiveram livre acesso a ração comercial. No 120° dia de vida, passamos a ter 3 grupos experimentais, uma vez que os animais do grupo superalimentado foram subdivididos aleatoriamente em 2 novos grupos:

- Grupo controle (NL, n=10) - receberam ração comercial até 180 dias de idade por 2 meses;

- Grupo superalimentado (SL, n=10) - animais do grupo S que receberam ração comercial por 2 meses;

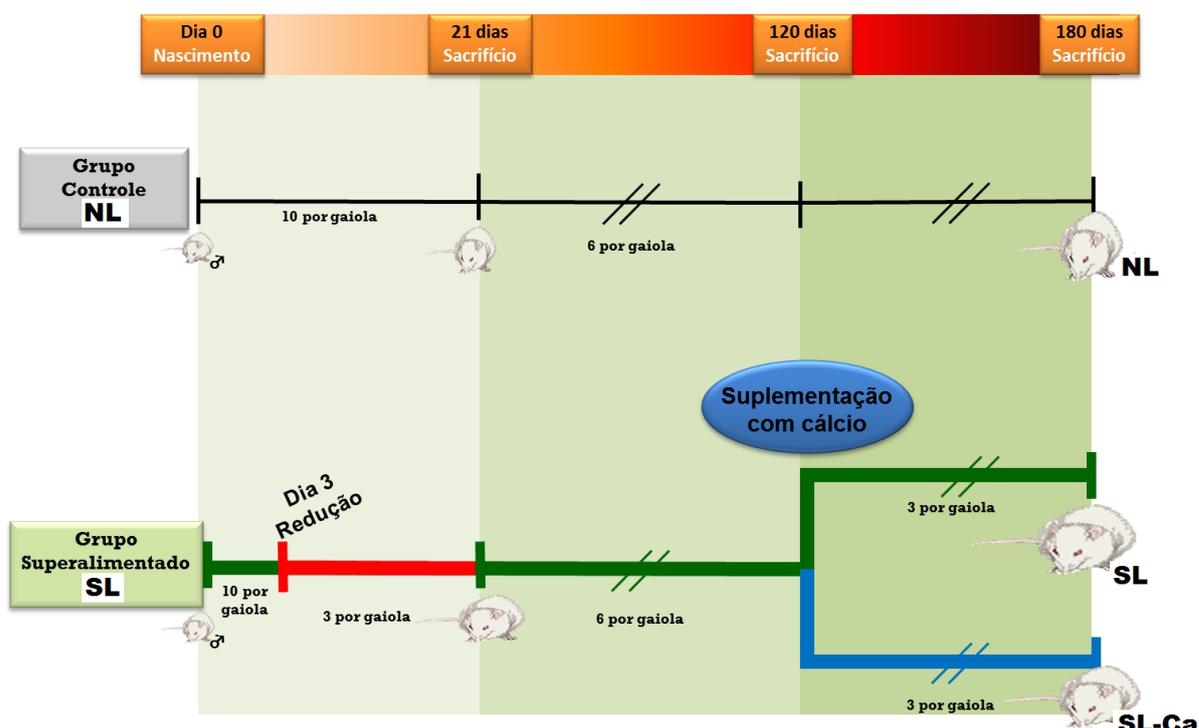
- Grupo superalimentado + cálcio (SL-Ca, n=10) - animais do grupo S que receberam ração comercial suplementada de carbonato de cálcio por 2 meses.

2.2 Preparo da ração suplementada com carbonato de cálcio

A ração comercial foi triturada e o carbonato de cálcio (Vetec Química Fina Ltda, RJ, Brasil) adicionado a esta numa quantidade correspondente a duas vezes o recomendado para ratos (10g de carbonato de cálcio/Kg de ração) (Reeves et al., 1993). Para o preparo dos novos pellets, foi adicionado um pouco de água e homogeneizada em batedeira por 10 minutos a fim de torná-la com uma consistência adequada para formação dos novos *pellets*. Em uma estufa industrial os *pellets* foram aquecidos a 60°C por 24 horas para secarem.

Figura 3 - Esquema do modelo experimental de redução da ninhada.

Modelo de obesidade por redução do tamanho da ninhada



Legenda: Modelo de de obesidade induzido pela redução do tamanho da ninhada e terapia de reverção da obesidade pela suplementação com cálcio na idade adulta.

Fonte: A autora, 2016

2.3 Avaliação do estado nutricional

Massa corporal: durante os 21 dias da lactação, a massa corporal dos filhotes foi avaliada diariamente, e após o desmame, será monitorada de 4 em 4 dias até os 180 dias de idade.

Ingestão de ração: após o desmame, a ingestão alimentar será acompanhada de 4 em 4 dias até 180 dias de idade. A quantidade de ração ingerida será estimada pela diferença entre o peso da ração que restar na gaiola (R_f) e a quantidade total colocada 4 dias antes (R_i), de acordo com a fórmula:

$$\text{Ingestão de ração (g)} = \left[\frac{R_i - R_f}{n} \right] / 4$$

“n” corresponde ao número de animais em cada gaiola, e “4” é o número de dias.

2.4 Estudo de preferência alimentar

Para avaliar os tando o efeito da programação quanto o efeito da dieta enriquecida com cálcio sobre a preferência entre duas dietas palatáveis, apenas em PN175 os grupos foram submetidos a avaliação da preferência por 30 minutos e 12 horas. O teste ocorreu após 12 horas de jejum, começando as 21:00 até as 9:00 do dia seguinte, esse período corresponde ao período de maior atividade dos ratos. Para evitar o efeito estressante do isolamento durante o experimento em cada gaiola, do tamanho usual, foram mantidos 2 ratos. Foram oferecidos dois tipos de dietas (Tabela 2): Dieta com alto teor de açúcar (DA), 38% composta de sacarose; e uma dieta com alto teor de lipídios (DL), com 20% de gorduras saturadas. A diferença de peso entre a ração ofertada e o resto da ração no comedouro da gaiola, dividido pelo o número de ratos na gaiola, foi considerado como consumo por animal ao final de cada período (30 minutos e 12 horas).

Tabela 1 - Composição das dietas ofertadas no estudo de preferência alimentar

| | Açúcar (g) | Lipídio (g) | Proteína (g) | Valor energético (kcal) |
|-----------------------------|------------|-------------|--------------|-------------------------|
| Ração padrão (RP) | 66.0 | 11.0 | 23.0 | 455 |
| Dieta rica em açúcar (DA) | 78.9 | 6.8 | 14.3 | 461 |
| Dieta rica em lipídios (DL) | 58.9 | 26.8 | 14.3 | 561 |

Legenda: Valor relativo a 100 g de cada ração.

Fonte: A autora, 2016

2.5 Eutanásia

Em PN21, PN120 e PN180, os animais foram anestesiados com Hypnol® (Pentobarbital sódico) para a avaliação da atividade elétrica nervosa e após eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos heparinizados e centrifugado (133 xg / 25 min / 4°C) para obtenção do soro, que foi armazenado a -20°C para dosagens posteriores.

Amostras do tecido adiposo branco visceral (retroperitoneal, epididimal e mesentérico), fígado, tecido adiposo marrom intraescapular foram armazenados à -20°C para quantificar o conteúdo de proteínas e análises histológicas. As glândulas adrenais direitas foram utilizadas para avaliação por Western blotting e as glândulas adrenais esquerdas foram pesadas, armazenadas em ácido acético (10%) à -20°C para quantificação do conteúdo de catecolaminas. O cérebro inteiro foi recolhido e acondicionado em freezer (-80°C) para posterior isolamento de áreas específicas.

2.6 Atividade Elétrica dos Nervos Parassimpático e Simpático

Para registrarmos a atividade elétrica autônoma ratos de cada grupo foram anestesiados com pentobarbital sódico (90 mg/kg de peso corporal) após 12h de jejum. Para a avaliação da atividade elétrica simpática no tecido adiposo marrom intraescapular foram isolados apenas um dos 5 feixes nervosos intercostais do lado esquerdo com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Foster et al., 1982). Após a exposição os nervos foram postos sobre um eletrodo bipolar de platina (Insight®, Ribeirão Preto, Brasil) através dos quais foram captados os impulsos elétricos. Os nervos foram recobertos com óleo mineral para evitar o ressecamento. O eletrodo encontra-se conectado a um dispositivo eletrônico (Bio-Amplificador, Insight®, Ribeirão Preto, Brasil) que amplifica o sinal elétrico em 10000 vezes e filtra as frequências baixas entre 1-60 kHz. Os sinais nervosos foram captados por software desenvolvido pela ADInstruments (8SP, New South Wales, Austrália). Durante o período de aquisição de dados, os animais permaneceram no interior de uma gaiola de Faraday para evitar interferências eletromagnéticas, e sob aquecimento com uma lâmpada com infravermelho. A aquisição de dados foi realizada por 10 minutos após estabilização. Atividade elétrica do nervo foi analisada considerando o número médio de picos acima da linha zero mV no período de 5 segundos (Scomparin et al., 2009).

2.7 Avaliação da adiposidade visceral

Em PN170 os ratos foram anestesiados com hidrocloreto de quetamina (0.1 ml / 100 g - Cetamin®) e tiveram sua massa gorda avaliada em um aparelho de absorptometria radiológica de dupla energia (Lunar DXA 200368 GE instrument, Wisconsin, USA). Adicionalmente, no em PN120 e PN180 para avaliar adiposidade central, dissecamos e pesamos a MGCV, que consiste na soma dos depósitos de gordura do retroperitônio, mesentério e epidídimo (Figueiredo *et al.*, 2011).

2.8 Isolamento da área tegumentar ventral (VTA), núcleo accumbens (NAc) striatum dorsal (DS), núcleo arqueado (ARC) e núcleo para ventricula (PVN).

Cérebros inteiros congelados foram cortados com um criostato (Hyrax C25, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Agulhas especiais foram utilizadas para recolher estruturas cerebrais de acordo com a tabela 3 (Paxinos & Watson, 2007). As regiões coletadas foram homogenizadas de acordo com o protocolo de processamento para dosagem de proteínas e western blott.

Tabela 2 - Especificações para obtenção das regiões estudadas.

| Regiões cerebrais | Bregma | Espessura da agulha |
|--------------------------|-------------------|----------------------------|
| VTA | -5.60 to -6.30 mm | 700 μ m x 0.5 mm |
| NAc | 1.70 to 0.48 mm | 1.220 μ m x 0.75 mm |
| DS | 1.70 to 0.48 mm | 1.220 μ m x 2.0 mm |
| ARC | -1.6 to -2.6 mm | 1.500 μ m x 2.0 mm |
| PVN | -1.8 to 2.1 mm | 700 μ m x 0.5 mm |

Fonte: A autora, 2016

2.9 Determinação das concentrações plasmáticas hormonais

Amostras de plasma das proles foram utilizadas para as dosagens séricas de insulina, corticosterona, Vitamina D total e leptina. Cada avaliação foi realizado em duplicata e cada ensaio foi único, dispensando a avaliação do coeficiente de variação interensaio.

- A insulina foi avaliada utilizando o kit específico para murinos (ImmuChemTM ¹²⁵I, duplo anticorpo, ICN Biomedicals, Inc Cleveland, OH, EUA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi 5%, sendo o limite mínimo de detecção de 0.1 ng/ml.

- A corticosterona total foi medida por RIE utilizando o kit comercial (ImmuChem™ 125I, duplo anticorpo, ICN Biomedicals, Inc Cleveland, OH, EUA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 5% e o limite mínimo de detecção de 25 ng/ml.

- A leptina foi avaliada por imunoenensaio enzimático para ratos (EZRL-83K) de acordo com as especificações do fabricante (ELISA kit, LINCO Research, St. Charles, U.S.A.). O limite mínimo de detecção é 0,04 ng/mL.

- A vitamina D total foi quantificada por ensaio de ligação proteica por eletroquimioluminescência (Elecsys and Cobas immunoassay analyzers, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), sendo a faixa de detecção 3.00 – 70.0 ng/mL.

2.10 Análise da expressão de proteínas por Western Blotting

Glândulas adrenais direitas foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato (pH 7.4), contendo 1 µL de coquetel inibidor de proteases (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-free, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e centrifugados (1.920 xg, 4°C por 5 min).

O fígado, tecido adiposo visceral e marrom (100 mg) foram homogeneizados em 700 µL de tampão de RIPA (20 mM Tris-HCl (pH 7.5); 150 mM NaCl; 1 mM Na₂; 1 mM EDTA; 1% NP-40; 2.5 mM pirofosfato de sódio; 1 mM β-glicerofosfato; 1 mM Na₃) com 1 µL de coquetel de inibidores de proteases e centrifugados (3.596 xg, 4°C por 25 min).

Hipotálamo dos animais de 120 e 180 dias foram homogeneizados com 200 µL de tampão de lise com 1 µL de coquetel inibidores de proteases e centrifugados (3.596 xg, 4°C por 25 min) para a avaliação do conteúdo de neuropeptídeos orexígenos, anorexígenos, de enzimas da via de sinalização da leptina e do sistema mesocorticolímbico dopaminérgico.

A concentração protéica foi determinada usando ensaio colorimétrico kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific Inc., Barrington, IL, EUA) seguindo as recomendações do fabricante e a leitura foi realizada a 540 nm. As amostras foram desnaturadas em tampão de amostras (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0.001% bromofenol azul) e aquecidas a 95°C por 5 min.

As amostras foram analisadas pelo método SDS-PAGE. Foram pipetados 10 µg de proteína dos homogenatos em poços no gel de 10% de poliacrilamida para eletro-separação. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA).

Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas (1½ h) em T-TBS acrescido de albumina a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 90 min. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o anticorpo primário na concentração de 1:1.000, específico para cada proteína (*overnight*, a 5°C): anti-TH (T2928 - Sigma-Aldrich MO, USA); anti-ADRβ3 (sc-50436 - Santa Cruz Biotechnology Inc. Finnell St, Dallas, USA), anti-PPARα (ab8934 - Santa Cruz Biotechnology Inc), anti-PGC1α (sc-13067 - Santa Cruz Biotechnology Inc), anti-UCP1 (SAB1404511); anti-ADRβ2 (ab36956 - Santa Cruz Biotechnology Inc); anti-CPT1 (SAB1404511 - Sigma-Aldrich Inc.); anti-TRβ1 (S-18: sc-33313 - Santa Cruz Biotechnology Inc); superóxido dismutase 1 e 2 (SOD1 and SOD2; Santa Cruz, sc-11407 and sc-133134), glutationa peroxidase (GPx; Santa Cruz Biotechnology Inc, sc-133152), catalase (CAT; Sigma-Aldrich, C0979); anti-ácido graxo sintase – FAS (ab150508 - Abcam Cambridge, UK); Akt (sc-8312 - Santa Cruz Biotechnology); Akt fosforilada (sc-135650 - Santa Cruz Biotechnology); aduto proteico de 4-hidroxinonal – 4-HNE (sc-130083 - Santa Cruz Biotechnology), 3-nitrotirosina (sc-55256, Santa Cruz Biotechnology), receptor de glicocorticóide alfa – GR-alfa (sc-12763 - Santa Cruz Biotechnology); 11beta-hidroxiesteóide desidrogenase tipo 1 - 11B-HSD1 (sc-20175 - Santa Cruz Biotechnology); Neuropeptide Y – NPY (N9525 - Sigma-Aldrich Co); anti-POMC (sc-20148 - Santa Cruz Biotechnology Inc); anti-MC4R (ab24233 - Abcam, MA, UK); anti-transportador de dopamina (DAT) (B1591P - LifeSpan BioSciences, Inc.); anti-receptor de dopamina (D1R) (MAB5290 - Merck Millipore Co); anti-receptor de dopamina 2 (D2R) - (AB5084P - Merck Millipore, Darmstadt, Germany); anti-POMC (sc-20148 - Santa Cruz Biotechnology); Como controle foram utilizados anti-β-actin - (A2066 - Sigma-Aldrich Co.) e anti-β-tubulina (T8328, - Sigma-Aldrich Co) para os homogenatos de todos os tecidos (com anticorpos da Santa Cruz Biotechnology Inc.). Após este período, as membranas foram lavadas e incubadas com 2º anticorpo conjugado à biotina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 1 h (25°C) sob agitação constante. Após mais uma sequência de lavagens, as membranas foram incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase (Zymed, South San Francisco, CA, EUA), na mesma concentração do anticorpo secundário utilizado (1 h, 25°C). As membranas foram lavadas novamente com T-TBS e tratadas com kit de quimioluminescência (ECL-

plus; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) e exposto no ImageQuant LAS (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) para a obtenção de imagens para a obtenção de imagens.

As imagens das bandas foram analisadas e quantificadas com auxílio do programa Image J 1.34s (Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda, MA, EUA). Utilizamos a β -tubulina como controle interno.

2.11 Ensaios de Real Time-PCR

Para as análises de RT-PCR, o RNA total foi extraído do tecido adiposo visceral, rim e fígado com o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e quantificado via a NanoVueTMPlus Espectrofotometro (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 mg do RNA total usando o Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV), primer Oligo (dT)15 e dNTPs (Promega, Madison, WI, EUA). Os níveis de mRNA do VDR, 1α -hidroxilase, C/EBP- β e do PPAR γ foram amplificados no Sistema PCR tempo real AppliedBiosystems 7500 (Life Technologies Co.) usando PCR Master Mix (AppliedBioSystem, Fostercity, CA, EUA) de acordo com as instruções. Os primers de oligonucleotídeos foram preparados pela ABI AppliedBiosystem (Foster city, CA, EUA), a sequência dos primers usados para amplificação foram:

Quadro 2 - Primes utilizados

| | | |
|--------------------------------|--|--|
| Tecido adiposo visceral | C/EBP-β: | F - 5' - ATG CAA TCC GGATCA AAC GT-3' R - 5' - CCG CAG GAA CAT CTT TAA GTG A-3' |
| | PPARγ: | F - 5' - ATT CTG GCC CAC CAA CTT CGG-3' R - 5' - TGG AAG CCT GAT GCT TTA TCC CCA-3' |
| | 1α-hidroxilase: | R - 5' - AGC TAA TGT CCG TAA CCC AAC AC-3' F - 5' - TTG TAC TCC ATG CTG TCC TTG AA-3' |
| | VDR: | R - 5' - CAG CAT GGA GAG AGG AGA CAG-3' F - 5' - TCG TAT GGA CGG AAG TAC AGG-3' |

Fonte: A autora, 2016

A co-amplificação do 36-b4 mRNA, controle interno, foi usado para todas as amostras. Os ensaios foram feitos com as amostras em triplicata e o resultado normalizado pelo 36-b4 mRNA.

2.12 Determinação de catecolaminas totais na adrenal

Dosamos o conteúdo de catecolaminas totais na adrenal pelo método fluorimétrico do trihidroxiindol, descrito anteriormente (Trevenzoli *et al.*, 2007). As glândulas adrenais esquerdas foram cuidadosamente dissecadas, pesadas em balança de precisão, mantidas em ácido acético 10% e armazenadas a -20°C até o processamento do tecido. Para extrair as catecolaminas, as adrenais foram homogeneizadas manualmente em 500 µl de ácido acético 10% e centrifugadas (10.000 xg /1 min), para utilização do sobrenadante. No ensaio fluorimétrico, utilizamos padrões de adrenalina (Adren®, Hipolabor, BH, Brasil) diluída em ácido acético 10%. Em 50 µL de cada padrão ou amostra, adicionamos 250 µL de tampão fosfato 0,5 M, pH 7,0 e 25 µL de ferricianeto de potássio 0,5%. A solução foi homogeneizada, incubada por 20 minutos e paralisada com 500 µl de ácido ascórbico (60mg/mL)/NaOH 10M, na proporção 1:19. Adicionamos 2 mL de água destilada, sendo a solução novamente homogeneizada e submetida à leitura em espectrofluorímetro (Hidex, Turku, Finland). Os comprimentos de onda para a leitura foram 420 nm de excitação e 510 nm de emissão. As dosagens foram feitas em duplicata, com os tubos de ensaio sob refrigeração durante todo o procedimento. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

2.13 Triglicerídeo e colesterol hepático

O conteúdo total de triglicerídeo e de colesterol hepático foram avaliados por adaptação de metodologia previamente descrita por Folch e colaboradores (1957). Resumidamente, 50 mg de fígado foram homogeneizados em 1 mL de isopropanol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) e centrifugados (740 xg, 10 minutos a 4°C). O conteúdo de triglicerídeo em 20 µL do sobrenadante foi quantificado com kit

colorimétrico de acordo com as especificações do fabricante (Bioclin, BH, MG, Brasil). A leitura foi realizada a 490-540 nm em espectrofluorímetro (Hidex, Turku, Finland). Para a avaliação do conteúdo de colesterol, 20 µL do sobrenadante foi quantificado com kit colorimétrico de acordo com as especificações do fabricante (Bioclin, BH, MG, Brasil). A leitura foi realizada a 490-540 nm em espectrofluorímetro (Hidex, Turku, Finland).

2.14 Atividade enzimática antioxidante

O fígado foi homogeneizado em tampão de fosfato de potássio com EDTA. Após centrifugação (3398 xg, 10 min, 4 ° C), homogeneizados de fígado foram armazenadas a -80 ° C até que cada ensaio de parâmetros oxidativo. O conteúdo de proteína total de fígado e de plasma foram determinadas utilizando o Kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, CA, EUA). O homogenato de fígado e o plasma foram usados para realizar as seguintes atividades enzimáticas:

A atividade da superóxido dismutase foi medida através da inibição da auto-oxidação da adrenalina a 480 nm de absorvância (& Bannister Calabrese, 1987). Atividade da glutathione peroxidase foi avaliada através da medição da oxidação do NADPH, em presença de H₂O₂ a 340 nm (Flohe & Günzler, 1984). Atividade catalase foi determinada pela taxa de diminuição em H₂O₂ a 240 nm (Aebi, 1984). As atividades enzimáticas foram expressas como U / mg de proteína.

As razões SOD / GPx e SOD / (GPx + CAT) foram calculadas, porque os dados anteriores demonstraram que esses índices são mais importantes do que a atividade absoluta e está relacionada ao nível oxidativo celular (de Haan et al., 1996).

2.15 Avaliação da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica foi estimada pela quantificação do malondialdeído (MDA) pela reação com o ácido tiobarbitúrico substâncias (TBARS) (Vynche, 1970). O fígado foi homogeneizado em tampão de fosfato com EDTA. O homogenato de fígado e de plasma foram misturados com ácido tricloroacético a 10% (1: 2) e centrifugados (212

mg, 10 min, 4°C). Depois, 500 µl de sobrenadante foi incubado com 500 µl de ácido tiobarbitúrico (0,67%) durante 30 minutos (95 °C). A absorvância foi lida num espectrofotômetro (532 nm). Os resultados foram expressos em mol / mg e de proteína.

2.16 Determinação da concentração de grupamentos carbonilados em proteínas

A oxidação de proteínas foi avaliada no fígado e plasma de acordo Levine et al. (1990) pela reação dos grupamentos carbonil com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (Sigma-Aldrich Missouri, EUA). Os valores de absorvância foram obtidos a 380 nm e expressos em nmol / mg de proteína.

2.17 Análises histológicas

Amostras de fígado, tecido adiposo marrom e tecido adiposo epididimal foram fixadas em tampão de formalina 0.1 M e salina 0.9% (pH 7.2), desidratados com concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%), clarificados com xilol e emblocados com parafina. Foram recolhidos cortes não consecutivos de 10 micrometros de espessura para a coloração com hematoxilina e eosina. De cada rato foram obtidas três lâminas e de cada lâmina foram tiradas 5 fotos de campos diferentes com microscópio (Laser Microdissection Systems Leica LMD6500) utilizando uma objetiva de 60x. As imagens foram analisadas com o software Image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

2.18 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). O programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad softwares, Inc., San Diego, CA, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas e para obtenção dos gráficos. Quando dois grupos eram avaliados, os dados foram analisados utilizando teste T não-paramétrico não

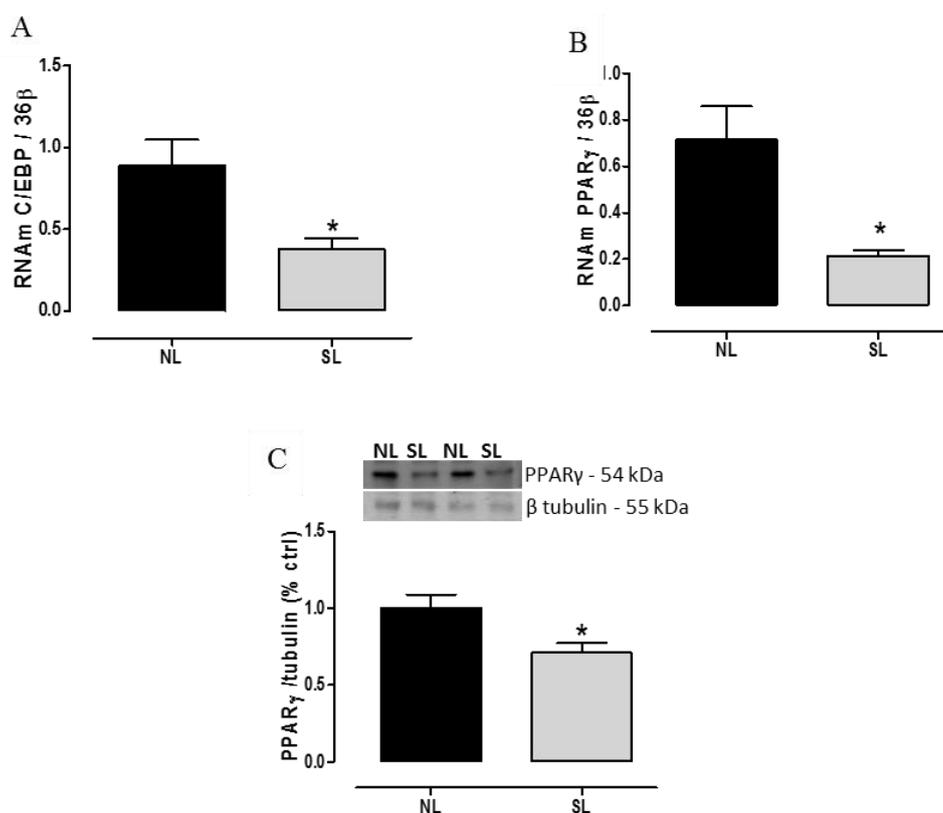
pareado, seguido de Mann-Whitney U como pos-teste. Os demais dados foram analisados usando o teste T Student não-pareado. Quando três grupos eram avaliados os dados foram analisados através de análise de variância bi-variada (Two-way ANOVA) seguido de pós-teste de Newman Keuls. Os dados experimentais foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito da superalimentação sobre marcadores de adipogênese no TAV ao desmame

No TAV detectamos menor RNAm C / EBP (-57%, $P = 0,0082$; Gráfico 1A), menor mRNA de PPAR γ (-62%, $P = 0,0003$; Gráfico 1B) e menor conteúdo de proteína PPAR α (-29%, $P = 0,025$; Gráfico 1C) em filhotes SL comparação com os filhotes NL.

Gráfico 1- O efeito da redução do tamanho da ninhada sobre marcadores e adipogênicos lipogênicos no tecido adiposo visceral aos 21 dias de idade



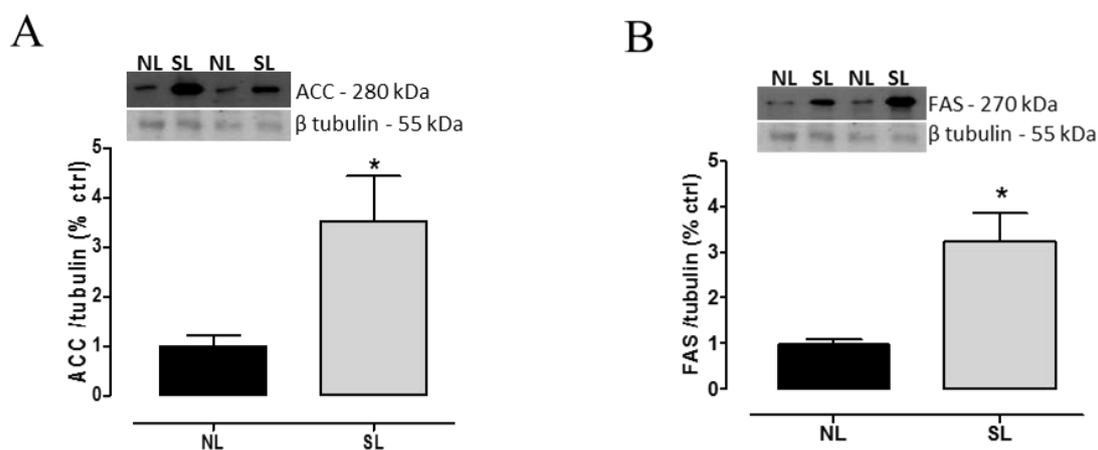
Legenda: Conteúdo de RNAm de C / EBP β (A) e PPAR γ (B), conteúdo proteico de PPAR γ (C) no tecido adiposo visceral a partir de ratos criados em ninhadas normais (NL) e pequenas ninhadas (SL) durante a lactação. Os blots representativos de proteínas são apresentados em cima gráficos C, D e E. conteúdo β -tubulina foi utilizada como controlo de carregamento. Os resultados são expressos como relação (%) para o grupo de controlo e como média \pm SEM; $n = 4-7$ por grupo; * $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

3.2 Efeito da superalimentação sobre marcadores de lipogênese TAV ao desmame

As enzimas lipogênicas ACC e da FAS foram maiores (+ 252%; P = 0,01; Gráfico 2A e + 223%; P = 0,002; A Gráfico 2B, respectivamente) em VAT no grupo SL.

Gráfico 2- O efeito da redução do tamanho da ninhada sobre marcadores lipogênicos no tecido adiposo visceral aos 21 dias de idade



Legenda 2: Conteúdo proteico de ACC (A) e FAS (B) no tecido adiposo visceral a partir de ratos criados em ninhadas normais (NL) e pequenas ninhadas (SL) durante a lactação. Os blots representativos de proteínas são apresentados em cima gráficos C, D e E. conteúdo β -tubulina foi utilizada como controlo de carregamento. Os resultados são expressos como relação (%) para o grupo de controlo e como média \pm SEM; n = 4-7 por grupo; * P < 0,05.

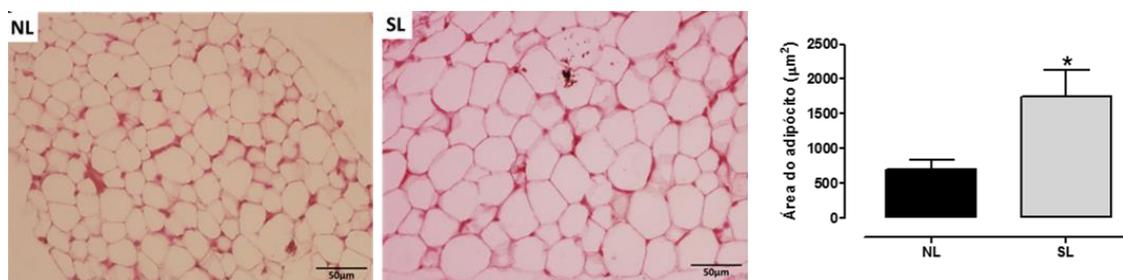
Fonte: A autora, 2016.

3.3 Efeito da superalimentação sobre a adiposidade visceral ao desmame

Como esperado, o grupo SL apresentados com maior massa gorda maior visceral (PN21: NL = 180,0 \pm 17,0 mg vs SL = 390,0 \pm 34,0 mg; P < 0,0001) e maior massa de gordura visceral relativa (PN21: NL = 4,76 \pm 0,3 vs SL = 8,25 \pm 0,6; mg tecidual (g de peso corporal)⁻¹), P < 0,0001) em comparação com o grupo de NL.

O grupo SL também tinha uma área maior de adipócitos (+ 148%; P < 0,05; Gráfico 3).

Gráfico 3- O efeito da redução do tamanho da ninhada na morfologia dos adipócitos aos 21 dias de idade



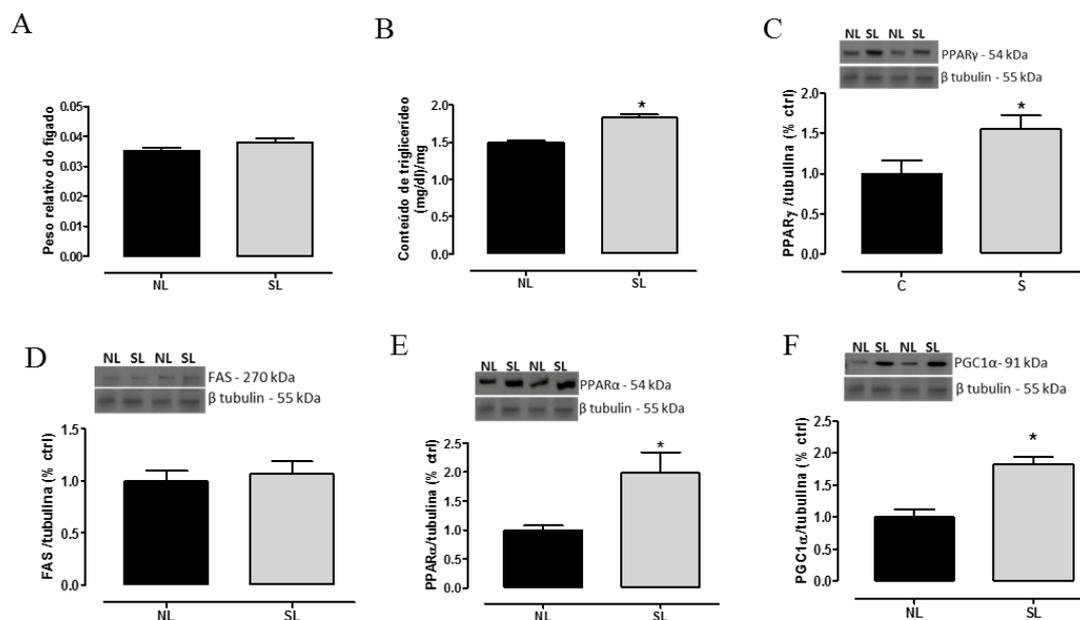
Legenda 3: Fotomicrografia representativa dos adipócitos viscerais e análise quantitativa da área de adipócito de ratos criados em ninhadas normais (NL) e pequenas ninhadas (SL) durante a lactação. Os valores são expressos como média \pm SEM; N = 4 por grupo; * P < 0,05.

Fonte: A autora, 2016.

3.4 Efeito da superalimentação sobre marcadores de lipogênese no fígado ao desmame

No desmame, a massa do fígado do grupo SL não foi diferente entre o grupo NL (Gráfico 4A), apesar de apresentarem com um conteúdo elevado de triglicérides no fígado (+ 22%, P < 0,0001; Gráfico 4B). O conteúdo de PPAR γ foi maior no grupo SL (+ 56%, P = 0,034; Gráfico 4C) e o conteúdo FAS manteve-se inalterado (Gráfico 4D). Os fatores de transcrição lipolíticas, PPAR α e PGC1 α , foram maiores no grupo SL (+ 98%, P = 0,03; Gráfico 4E e + 82%; P = 0,0004; Gráfico 4F, respectivamente).

Gráfico 4- O efeito da redução do tamanho da ninhada no metabolismo dos lipídios no fígado, aos 21 dias de idade



Legenda 4: Massa relativa (A), conteúdo de triglicérides (B) e conteúdo proteico de PPAR (C), FAS (D), PPAR α (E) e PGC1 α (F) ratos criados em ninhadas normais (NL) e pequenas ninhadas (SL) durante a lactação. Os blots representativos de proteínas são apresentados em cima gráficos C, D, E e F. conteúdo β -tubulina foi utilizada como controlo de carregamento. Os resultados são expressos como relação (%) para o grupo de controlo e como média \pm SEM; n = 6-10 por grupo; * P < 0,05.

Fonte: A autora, 2016.

3.5 Efeito da superalimentação sobre a função simpatoadrenal

Tanto as atividades simpáticas e parassimpáticas não foram alteradas no grupo SL. Nas glândulas suprarrenais, o conteúdo da catecolamina e o conteúdo da tirosina hidroxilase também não foram afetadas pela obesidade neonatal ao desmame. Quanto à análise dos receptores adrenérgicos, o conteúdo β 3ADR foi menor do TAV em filhotes de SL do que em filhotes NL, enquanto o conteúdo β 2ADR no fígado não foi alterada (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros referentes ao sistema nervoso autônomo em PN21.

| | NL | SL | <i>p</i> |
|---|-------------|-------------|----------|
| Número de despolarizações – TAM (picos/5seg) | 23.14 ± 2.9 | 20.53 ± 3.2 | 0.55 |
| Número de despolarizações – Vago (picos/5seg) | 18.13 ± 2.1 | 18.80 ± 2.3 | 0.83 |
| Conteúdo de catecolaminas adrenais (µM/mg) | 5.78 ± 1.4 | 8.36 ± 1.4 | 0.2 |
| Conteúdo de TH da glândula adrenal (% ctrl) | 1.00 ± 0.1 | 0.90 ± 0.1 | 0.7 |
| Conteúdo de β3ADR no TAV (% ctrl) | 1.00 ± 0.1 | 0.55 ± 0.1* | 0.01 |
| Conteúdo de β2ADR no fígado (% ctrl) | 1.00 ± 0.2 | 1.17 ± 0.3 | 0.58 |

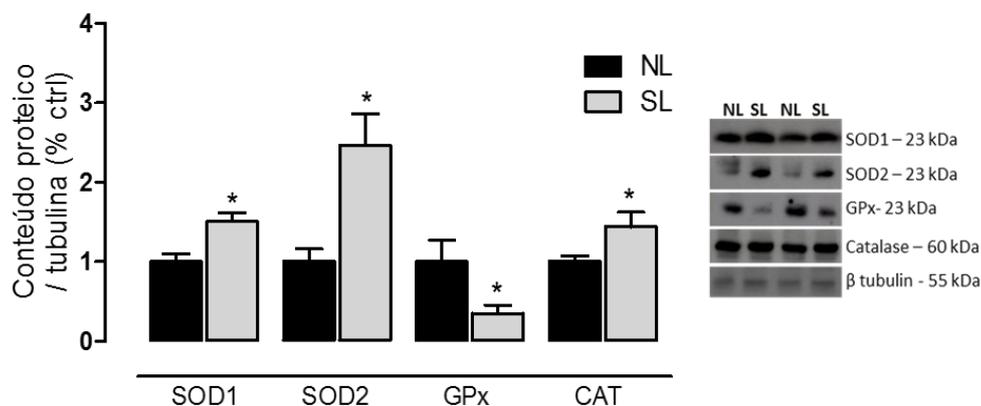
Nota: Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação; Tirosina hidroxilase, TH; receptor β3 adrenérgico, β3ADR; receptor β2 adrenérgico, β2ADR; tecido adiposo visceral, VAT. Resultados expressos como ± EPM de 10 ratos pro grupo. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$; * vs. NL.

Fonte: A autora, 2016.

3.6 Efeito da superalimentação sobre o conteúdo proteico de enzimas antioxidantes no fígado ao desmame

No fígado, SOD1, SOD2 e conteúdo de CAT foram aumentados, mas o conteúdo da GPx está diminuído (Gráfico 5A).

Gráfico 5- O efeito da redução do tamanho da ninhada sobre o conteúdo proteico de enzimas antioxidantes no fígado aos 21 dias de idade



Legenda 5: SOD1, SOD2, GPx e proteína CAT em ratos criados em ninhadas normais (NL) e pequenas ninhadas (SL) durante a lactação. Os blots representativos de proteínas são apresentados em cima gráficos. O conteúdo de β -tubulina foi utilizado como controle. Os resultados são expressos como relação (%) para o grupo de controle e como média \pm SEM; n = 6-7 por grupo; * P < 0,05.

Fonte: A autora, 2016.

3.7 Efeito da superalimentação sobre a atividade de enzimas antioxidantes ao desmame

No fígado, as atividades da SOD e catalase foram inalteradas, e a atividade da GPx encontra-se diminuída no grupo SL (-33%, P = 0,04; Tabela 4). A capacidade antioxidante total avaliada pela capacidade de eliminação do DPPH^{*} está reduzida no grupo SL (-50%, P = 0,03; Tabela 4). A relação entre as atividades das enzimas antioxidantes, SOD / GPx (Tabela 4) e SOD / (GPx + CAT) (Tabela 4), mantiveram-se inalteradas.

Na análise de plasma (Tabela 2), a SOD e atividade da GPx foi inalterado (Tabela 4) em ratos SL, enquanto que a atividade de CAT foi menor do que do grupo NL (-42%; P = 0,04). Estes animais também apresentaram maior SOD / GPx (+ 126%; P = 0,006) e SOD / (GPx + CAT) (+ 106%; P = 0,01), indicando uma condição oxidativo celular aumentada.

Tabela 4 - Atividade das enzimas antioxidantes em PN21.

| | NL | SL | p |
|-------------------------|--------------|---------------|-------|
| Fígado | | | |
| SOD (U/mg proteína) | 2138 ± 280 | 1975 ± 222 | 0.67 |
| GPx (U/mg proteína) | 0.332 ± 0.05 | 0.220 ± 0.01* | 0.04 |
| CAT (U/mg proteína) | 0.107 ± 0.01 | 0.104 ± 0.01 | 0.82 |
| SOD/GPx | 8187 ± 1708 | 8099 ± 757 | 0.96 |
| SOD/(GPx+CAT) | 5772 ± 1033 | 5493 ± 427 | 0.82 |
| % de sequestro de DPPH• | 15.68 ± 2.1 | 7.81 ± 2.6* | 0.03 |
| Plasma | | | |
| SOD (U/mg proteína) | 1861 ± 203 | 1790 ± 191 | 0.8 |
| GPx (U/mg proteína) | 0.037 ± 0.01 | 0.041 ± 0.01 | 0.72 |
| CAT (U/mg proteína) | 0.048 ± 0.01 | 0.028 ± 0.01* | 0.04 |
| SOD/GPx | 3316 ± 805 | 7496 ± 821* | 0.006 |
| SOD/(GPx+CAT) | 3091 ± 781 | 6363 ± 697 * | 0.01 |

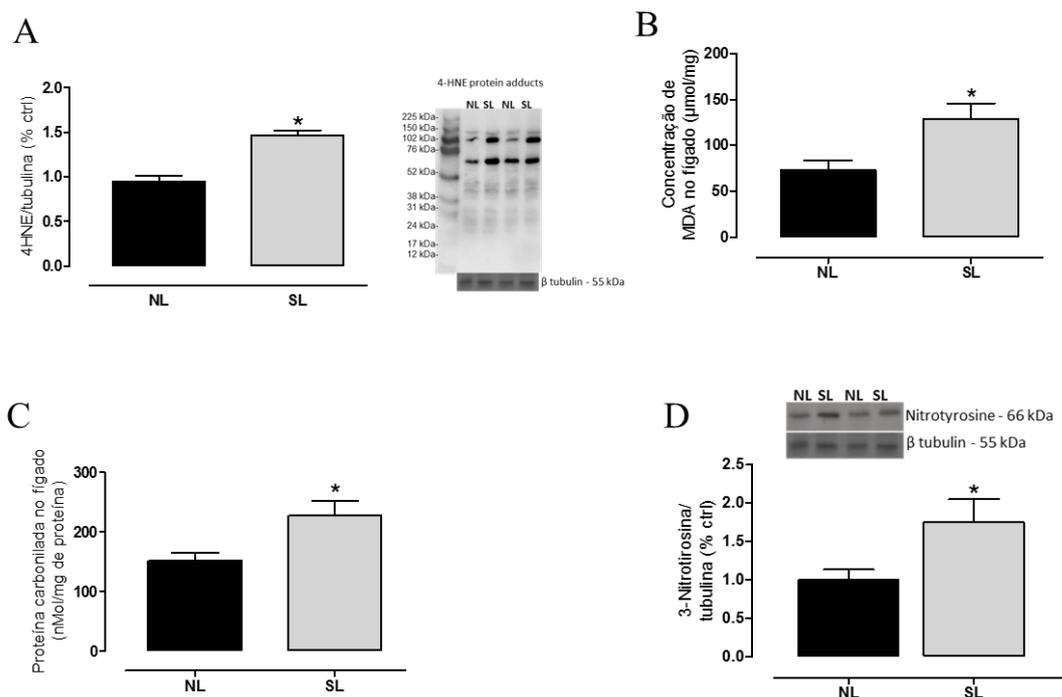
Nota: Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação; SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase; CAT, catalase; 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, DPPH•. Resultados expressos como ± EPM de 10 ratos para o grupo. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$; * vs. NL e # vs. SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.8 Efeito da superalimentação sobre marcadores de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica no fígado ao desmame

O conteúdo de proteínas carboniladas e de MDA foram aumentados nos ratos SL (+ 77%, $P = 0,02$, e + 50%, $P = 0,02$, respectivamente, Tabela 2), assim como os adutos proteicos de 4-HNE e o conteúdo de 3-nitrotirosina (Gráfico 4B e C, respectivamente).

Gráfico 6- O efeito da redução do tamanho da ninhada sobre o peroxidação e oxidação de proteínas



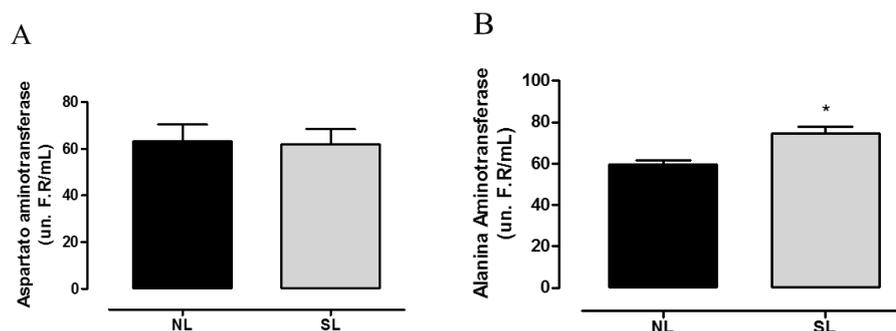
Legenda 6: Conteúdo proteico adutos de proteína 4HNE (A), conteúdo de MDA (B), conteúdo de proteínas carboniladas (C) e 3-nitrotirosina (D) de ratos criados em ninhadas normais (NL) e pequenas ninhadas (SL) durante a lactação. Os blots representativos de proteínas são apresentados em cima gráficos. O conteúdo de β -tubulina foi utilizado como controle. Os resultados são expressos como relação (%) para o grupo de controle e como média \pm SEM; n = 6-7 por grupo; * P < 0,05.

Fonte: A autora, 2016.

3.9 Efeito da superalimentação sobre marcadores de lesão hepática ao desmame

Em relação à análise das transaminases do plasma, apesar de ter atividade AST normal (Gráfico 7A), o grupo SL mostrou um aumento na atividade da ALT (+ 25%, P = 0,006; Gráfico 7B) comparado com o grupo de NL.

Gráfico 7- O efeito da redução do tamanho da ninhada sobre as enzimas de função hepática aos 21 dias de idade



Legenda 7: Atividade plasmática de aspartato aminotransferase - AST (A) e alanina aminotransferase - ALT (B) de ratos criados em ninhadas normais (NL) e pequenas ninhadas (SL) durante a lactação. Os resultados são expressos como média \pm SEM; n = 6-10 por grupo; * P < 0,05.

Fonte: A autora, 2016.

3.10 Efeito da superalimentação sobre marcadores de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica no fígado ao desmame

Ambos MDA e proteína conteúdo total de proteínas carboniladas foi aumentado no grupo de SL em comparação com o grupo de NL (+ 130%, P = 0,02, e + 162%, P = 0,01, respectivamente) Tabela 5.

Tabela 5 - Marcadores de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica no plasma em PN21.

| | NL | SL | p |
|---|------------------|--------------------|------|
| Concentração de MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) | 0.09 \pm 0.01 | 0.22 \pm 0.04 * | 0.02 |
| Proteína carbonilada (nMol/mg de proteína) | 310.4 \pm 60.4 | 813.5 \pm 140.9* | 0.01 |

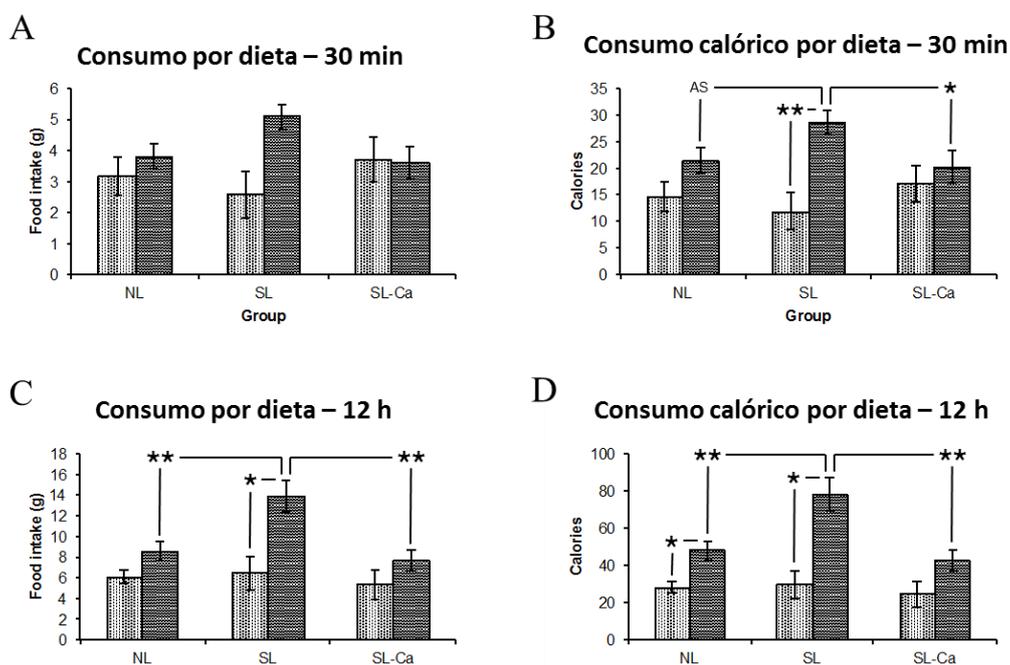
Nota: Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação; malondialdeído, MDA. Resultados expressos como \pm EPM de 10 ratos pro grupo. Os valores foram considerados significativos quando p < 0.05; * vs. NL.

Fonte: A autora, 2016.

3.11 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a preferência alimentar

O rANOVA global indicou interação significativa entre os grupos [$F = 20,4$ (2,30), $p < 0,001$] e a dieta [$F = 8,5$ (1,30), $p < 0,01$] no período de 12 h. Em relação ao consumo de à ração total (HSD + DH) (Gráfico 8A) a comparações de pares indica que o grupo SL comeu significativamente mais do que os outros dois grupos (FPLSD - $p < 0,001$ em ambas as comparações). No mesmo período de 12 h (Gráfico 8C), apenas o grupo SL mostrou uma significativa elevação do consumo de HFD quando comparado com um HSD (teste t emparelhado - $t = 2,4$, $p < 0,05$). Além disso, embora não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à quantidade de ração HSD consumida, o grupo SL comeu significativamente mais HFD do que os outros dois grupos (FPLSD - SL \times NL: $p < 0,01$; SL \times SL-Ca: $p < 0,001$). Não se observou efeitos significativos ou interação para o período de 30 min (Gráfico 8B).

Gráfico 8- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a preferência por ração hiperglicídica ou hiperlipídica



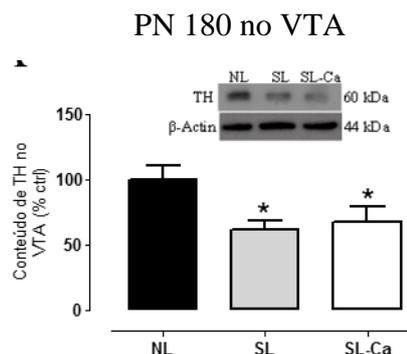
Legenda 8. Preferência por ração hiperglicídica em 30 minutos (A), em 12 horas (B), ou hiperlipídica em em 30 minutos (C) e em 12 horas (D). Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.12 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a sinalização dopaminérgica mesocorticolímbica no VTA

Na área tegmentar ventral os grupos SL e SL-Ca apresentaram reduzido conteúdo proteico de tirosina hidroxilase inferior em comparação ao grupo NL (-38% e -33%, $p < 0,05$ em ambas as comparações; respectivamente, Gráfico 9).

Gráfico 9- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre o conteúdo de TH em



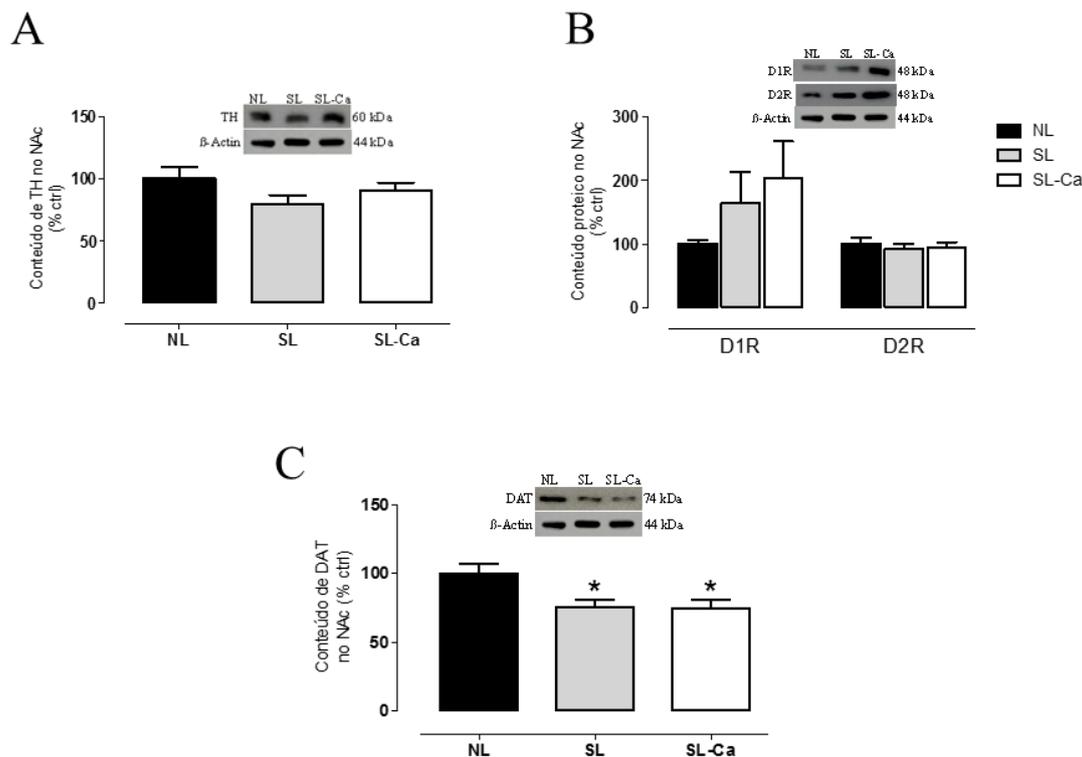
Legenda 9. As bandas representativas são mostradas ao lado do gráfico. O conteúdo proteico de β -actina foi utilizado como controle. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.13 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a sinalização dopaminérgica mesocorticolímbica no NAc

No núcleo accumbens, ambos os grupos SL e SL-Ca apresentaram um reduzido conteúdo proteico do transportador da dopamina quando comparado com o grupo NL (-24% e -25%, respectivamente, $p < 0,05$ em ambas as comparações; A Gráfico 10B). No entanto os conteúdos proteicos, tirosina hidroxilase, receptor de dopamina 1 e 2 (D1R e D2R, respectivamente) não foram significativamente alterados pela superalimentação precoce, bem como pela suplementação com cálcio (Gráficos 10A e 10C).

Gráfico 10- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a sinalização domaminérgica no NAc



Legenda 10. Conteúdo proteico de TH (A), no D1R e D2R (B) e DAT (C) no NAc. As bandas representativas são mostradas ao lado do gráfico. O conteúdo proteico de β -actina foi utilizado como controle. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

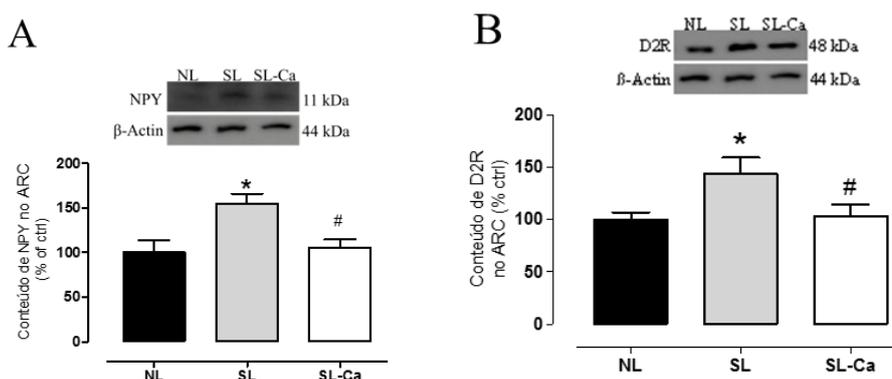
Fonte: A autora, 2016.

No striatum dorsal, não foi encontrada diferença estatística a respeito da tirosina hidroxilase, transportador de dopamina, e os teores de proteínas D1R D2R entre os grupos (dados não apresentados).

3.14 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a sensibilidade dopaminérgica hipotalâmica

O conteúdo proteico de NPY foi maior no grupo de SL (+ 55%, $P < 0,05$; Gráfico 11A) e foi normalizado no grupo SL-Ca. O conteúdo proteico POMC foi reduzido nos grupos SL e SL-Ca (-43% e -53%, $p < 0,05$, respectivamente; Gráfico 11B). No núcleo arqueado hipotalâmico, o grupo SL demonstrou maior conteúdo proteico de D2R quando comparado com os outros grupos (+ 44% vs NL; + 40% vs SL-Ca, $P < 0,05$ em ambas as comparações; Gráfico 11C).

Gráfico 11- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre o ARC



Legenda 11. Conteúdo proteico de NPY (A) e D2R (B) no ARC. As bandas representativas são mostradas ao lado do gráfico. O conteúdo proteico de β -actina foi utilizado como controle. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

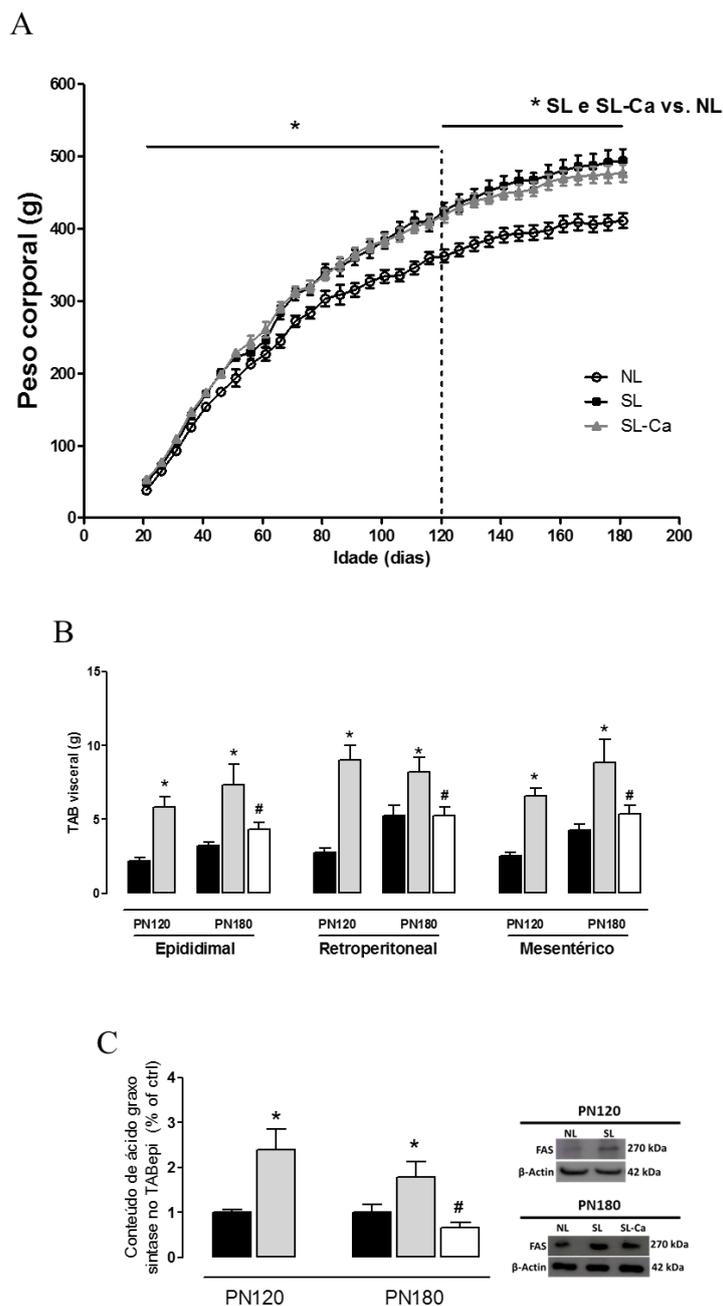
3.15 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre o peso corporal e adiposidade visceral

No PN120, o grupo SL apresentou maior massa corporal do que o grupo NL (+ 16%; $p < 0,001$) e, em PN 180, ratos SL e SL-Ca apresentaram maior massa corporal do que os ratos NL (Gráfico 12A).

Como esperado, a PN120 e PN180, ratos SL tinha adiposidade superior central, com depósitos de massa de gordura mais pesados (Gráfico 12B). A suplementação de cálcio foi capaz de normalizar a massa do TAV em todos os depósitos.

Detectamos um aumento no teor de proteína FAS epididimal no grupo SL em PN120 e em PN180, e a suplementação de cálcio foi capaz de normalizar o seu conteúdo (Gráfico 12C).

Gráfico 12- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre o peso corporal e adiposidade



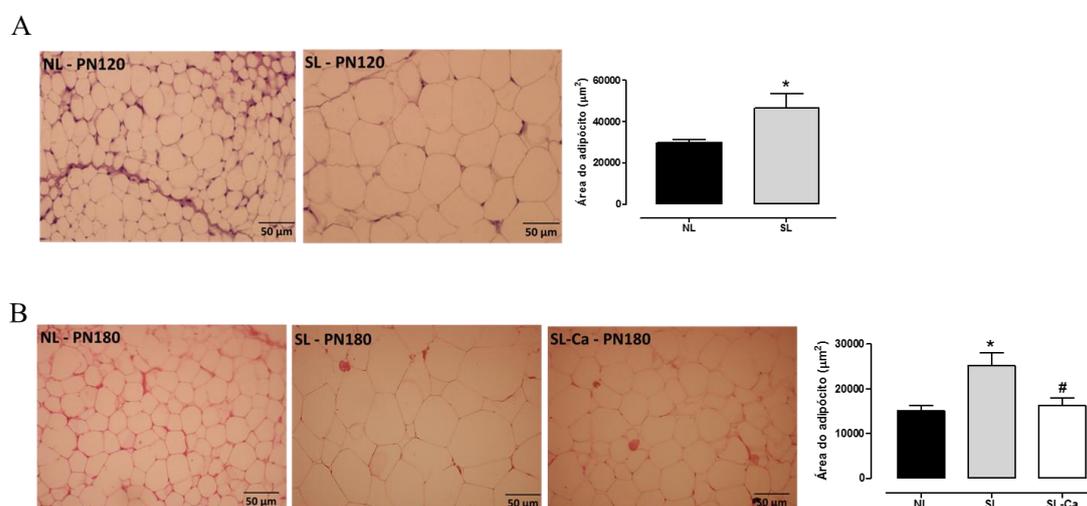
Legenda 12. Peso corporal (A), adiposidade (B) e conteúdo proteico de FAS (C). As bandas representativas são mostradas ao lado do gráfico. O conteúdo proteico de β -actina foi utilizado como controle. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.16 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a histologia do TAB epididimal

Ratos do grupo SL apresentam hipertrofia dos adipócitos epididimais comparadas com as de controlo, tanto no PN120 (+ 56%; $p = 0,027$ Gráfico 13A) e em PN180 (+ 67%; $p = 0,015$ Gráfico 13B). Dois meses de suplementação de cálcio reverteu essa alteração (-35% vs. SL; $P = 0,015$ Gráfico 13B).

Gráfico 13- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a área de adipócitos do tecido adiposo epididimal



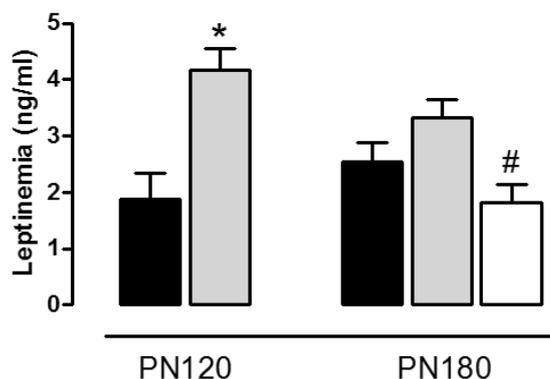
Legenda 13. Fotomicrografia representativa em PN120 (60x) e área do adipócito em PN120 (A). Fotomicrografia representativa em PN180 (60x) e área adipócito em PN180 (B). Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.17 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a leptinemia

A leptina no plasma foi maior no grupo SL PN120 (+ 121%; $p = 0,002$ Gráfico 14) comparado com o grupo de NL. Depois de 60 dias de suplemento de cálcio dietético, leptinemia voltou ao normal, sendo significativamente menores do que no grupo de SL (45%; $p = 0,016$).

Gráfico 14- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a leptinemia



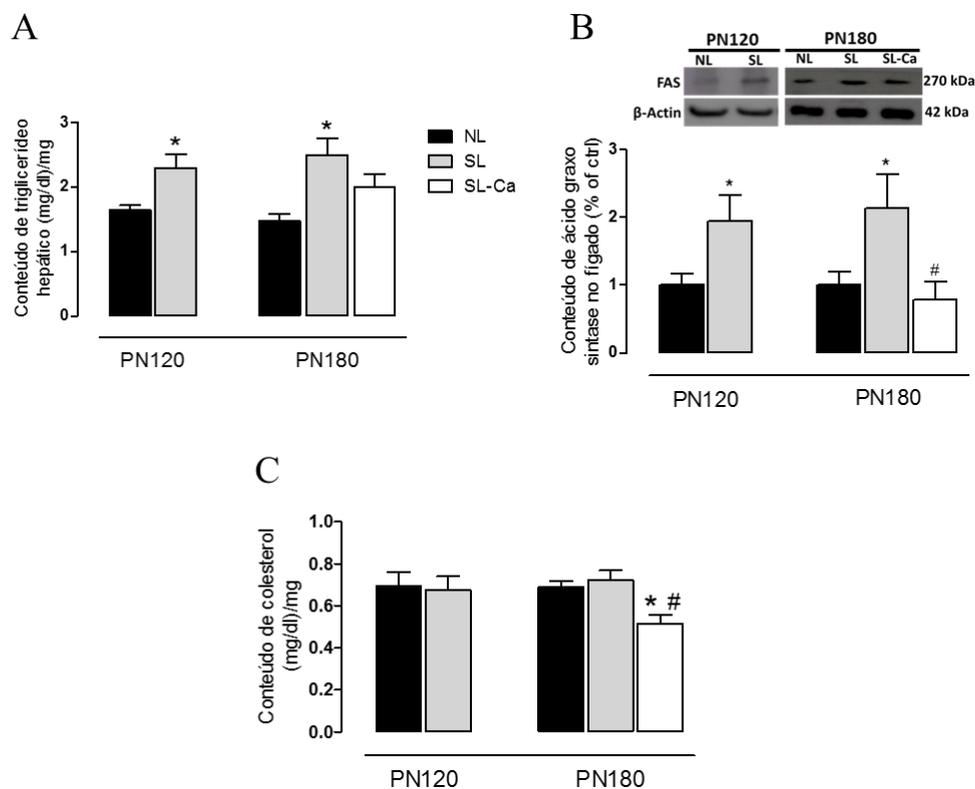
Legenda 14. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * P <0,05 em relação NL; # P <0,05 em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.18 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a lipogênese hepática em PN120 e PN180

No fígado, os ratos SL possuem maior conteúdo de triglicerídeo (PN120: + 40%; PN 180: + 69%, P <0,05) e de FAS (PN 120: + 94%; PN 180: + 113%, p <0,05) em comparação ao grupo NL. A suplementação de cálcio não alterou conteúdo de triglicerídeo (Gráfico 15A), mas FAS foi normalizada (Gráfico 15B). O conteúdo de colesterol do fígado foi diminuído no grupo SL-Ca (-28% vs SL, p <0,05, Gráfico 15C).

Gráfico 15- O efeito da suplementação dietética com cálcio no sobre parâmetros hepáticos



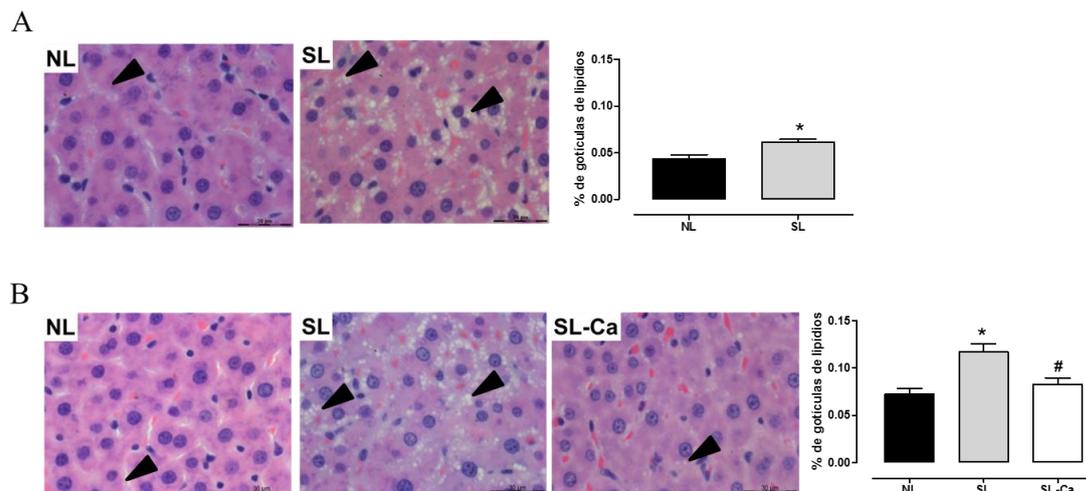
Legenda 15. Conteúdo de triglicérides (A) e colesterol (B). Conteúdo proteico de ácidos graxo sintase (FAS) (C) no fígado em PN120 e PN180. As bandas representativas são mostradas ao lado do gráfico. O conteúdo proteico de β -actina foi utilizado como controle. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * P < 0,05 em relação NL; # P < 0,05 em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.19 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a lipogênese hepática em PN120 e PN180

O grupo SL possui maior porcentagem de microgotículas de lipídio no fígado em PN120 (+ 30%, p < 0,01, Gráfico 16A) e PN180 (+ 62%, p = 0,002, Gráfico 16D) e a suplementação de cálcio foi capaz de reverter esse parâmetro (-29%, p = 0,002) (Gráfico 16D).

Gráfico 16- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a histologia hepática



Legenda 16. Fotomicrografia representativa da esteatose hepática (setas) em PN120 (60x) e área percentual esteatose (A). Fotomicrografia representativa da esteatose hepática (setas) em PN180 (60x) e área percentual esteatose (B) em PN180. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.20 Efeito de uma dieta rica em cálcio sobre a glicemia e insulinemia em PN120 e PN180

Em PN120 e PN180 os ratos do grupo SL possuem glicemia superior à dos ratos NL (+ 11% e + 13%, $p < 0,05$, respectivamente) e a suplementação de cálcio restaurou a glicemia (Tabela 6). Em PN120, insulinemia foi aumentada no grupo SL em comparação ao grupo NL (+ 36%, $P < 0,05$), no entanto, em PN180, não foi observada nenhuma alteração na insulinemia nos três grupos (Tabela 6).

Tabela 6 - Glicemia e insulinemia em PN120 e PN180.

| | PN120 | | | PN180 | | | |
|---------------------|------------|--------------|----------|------------|-------------|-------------------------|----------|
| | NL | SL | <i>p</i> | NL | SL | SL-Ca | <i>p</i> |
| Glicemia (mg/dL) | 92.9 ± 1.7 | 103.0 ± 1.9* | 0.001 | 80.8 ± 1.1 | 90.9 ± 2.6* | 84.3 ± 1.4 [#] | 0.002 |
| Insulina (μU/mL) | 37.5 ± 4.9 | 50.8 ± 3.4* | 0.04 | 56.1 ± 8.2 | 66.5 ± 8.9 | 60.7 ± 10.2 | 0.70 |

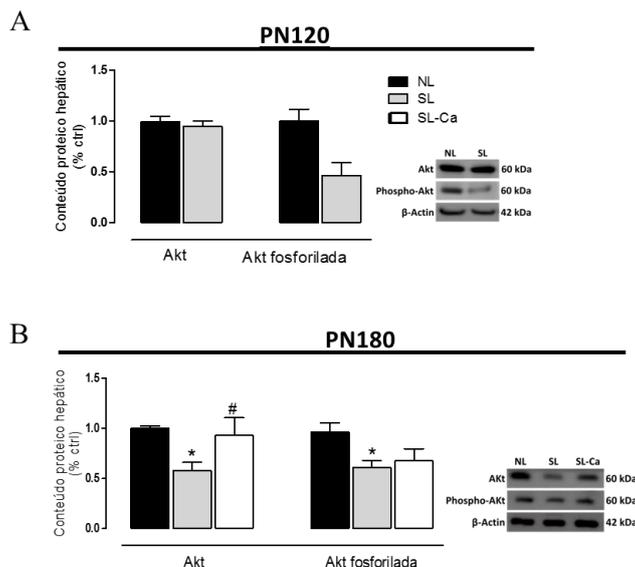
Nota: Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Resultados expressos como ± EPM de 10 ratos por grupo. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$; * vs. NL e # vs. SL.

Fonte: A autora, 2016

3.21 Efeito de uma dieta rica em cálcio sobre a sensibilidade hepática a insulina em PN120 e PN180

Em PN120, o grupo SL demonstraram menor conteúdo de Akt fosforilada no fígado (-53%, $p < 0,05$, Gráfico 17A). Em PN180, Akt total e Akt fosforilada foram menores em ratos SL em relação ao NL (-42% e - 36%, respectivamente, $p < 0,05$, Gráfico 17B) e só o conteúdo de Akt total foi restaurado pela suplementação.

Gráfico 17- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre o conteúdo Akt fígado



Legenda 17. Conteúdo proteico de Akt (A) e de Akt fosforilada em PN120. Conteúdo proteico de Akt e de Akt fosforilada na PN180 (B). As bandas representativas são mostradas ao lado do gráfico. O conteúdo proteico de β -actina foi utilizado como controle. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * P < 0,05 em relação NL; # P < 0,05 em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.22 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos em PN120 e PN180

Nenhuma mudança significativa foi detectada na prole SL em PN120. Em PN180, o grupo SL possui aumento de AST (+ 35%, P < 0,05) e da razão AST / ALT (+ 55%, p = 0,003) comparado com o grupo NL. Todas essas alterações foram revertidas com a suplementação com cálcio (Tabela 7).

Tabela 7- Parâmetros bioquímicos plasmáticos em PN120 e PN180.

| | PN120 | | | PN180 | | | |
|------------------------|--------------|--------------|----------|--------------|---------------|---------------------------|----------|
| | NL | SL | <i>p</i> | NL | SL | SL-Ca | <i>p</i> |
| Colesterol (mmol/L) | 46.3 ± 2.1 | 40.5 ± 3.5 | 0.17 | 61.6 ± 3.8 | 63.6 ± 2.7 | 59.4 ± 2.9 | 0.65 |
| Triglicerídeo (mmol/L) | 52.3 ± 3.7 | 59.2 ± 5.5 | 0.31 | 55.1 ± 4.8 | 56.3 ± 5.8 | 51.2 ± 6.3 | 0.80 |
| AST (un.F.R./mL) | 314.6 ± 22.9 | 304.4 ± 40.7 | 0.83 | 247.2 ± 20.6 | 334.8 ± 26.9* | 207.0 ± 18.0 [#] | 0.003 |
| ALT (un.F.R./mL) | 82.1 ± 9.1 | 75.6 ± 13.8 | 0.69 | 79.1 ± 4.9 | 77.7 ± 6.3 | 62.9 ± 3.8 | 0.07 |
| AST/ALT | 3.46 ± 0.19 | 4.91 ± 0.61 | 0.06 | 2.88 ± 0.27 | 4.46 ± 0.48* | 2.79 ± 0.24 [#] | 0.003 |

Nota: Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180. AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase. Resultados expressos como ± EPM de 10 ratos pro grupo. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$; * vs. NL e # vs. SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.23 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a atividade de enzimas antioxidantes no fígado em PN120 e PN180

Tal como ilustrado na Tabela 8, não se observou qualquer alteração da atividade de enzimas antioxidantes no fígado em PN120. No entanto, em PN180, a atividade SOD do fígado foi diminuída em grupos SL e SL-Ca (-31% e -23%, respectivamente, $p < 0,05$) e a atividade de CAT do fígado foi diminuída no grupo SL (-24%, $p < 0,05$) em relação ao grupo NL.

Tabela 8 - Atividade das enzimas antioxidantes no fígado em PN120 e PN180.

| | PN120 | | | PN180 | | | |
|---------------------|--------------|--------------|----------|--------------|--------------|---------------|----------|
| | NL | SL | <i>p</i> | NL | SL | SL-Ca | <i>p</i> |
| SOD (U/mg proteína) | 227.3 ± 22.4 | 198.9 ± 17.3 | 0.33 | 160.7 ± 15.3 | 110.4 ± 7.2* | 122.9 ± 10.4* | 0.02 |
| GPx (U/mg proteína) | 2.7 ± 0.4 | 2.2 ± 0.2 | 0.28 | 11.5 ± 0.6 | 10.3 ± 0.4 | 11.4 ± 0.6 | 0.20 |
| CAT (U/mg proteína) | 1.2 ± 0.1 | 1.2 ± 0.1 | 0.95 | 1.6 ± 0.1 | 1.2 ± 0.1* | 1.5 ± 0.1 | 0.01 |
| SOD/GPx | 82.1 ± 11.3 | 92.9 ± 11.8 | 0.52 | 12.2 ± 1.3 | 15.0 ± 1.2 | 11.3 ± 1.5 | 0.16 |
| SOD/(GPx+CAT) | 64.7 ± 10.9 | 60.4 ± 6.2 | 0.73 | 10.5 ± 1.0 | 12.7 ± 1.2 | 9.8 ± 1.4 | 0.24 |

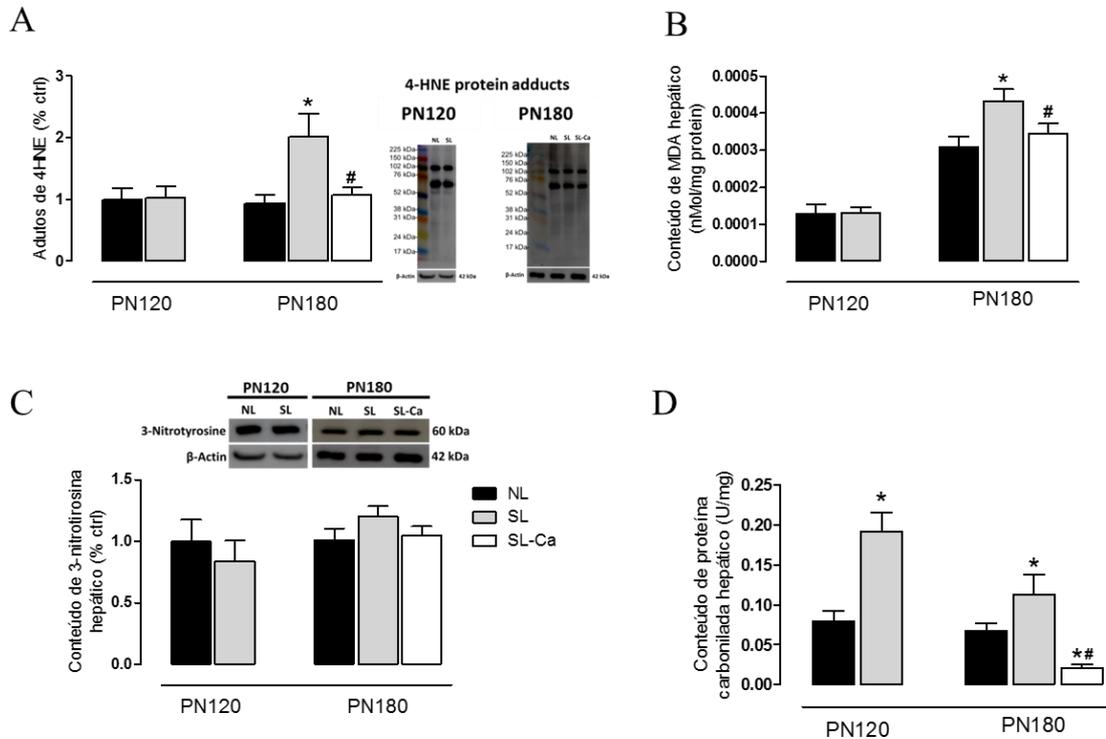
Notas: Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180. SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase; CAT, catalase. Resultados expressos como ± EPM de 10 ratos por grupo. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$; * vs. NL e # vs. SL.

Fonte: A autora, 2016

3.24 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a marcadores de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica no fígado em PN120 e PN180

Não houve diferença significativa no conteúdo de resíduos de 3-nitrotirosina no fígado em ambas as idades (Gráfico 18C). O conteúdo total de proteínas carboniladas do fígado é aumentado nos ratos SL em ambas as idades (PN 120: + 141%, 180 PN: + 66%, $p < 0,05$, Gráfico 18D) e a suplementação de cálcio diminui este conteúdo. No PN 120, adutos proteicos de 4HNE (Gráfico 18A) e conteúdo de MDA (Gráficos 18B) não foram diferentes entre os grupos. Em PN180, os adutos de 4 HNE foi maior no grupo SL (115%, $p < 0,05$), o que foi corrigido pela suplementação com cálcio. O mesmo padrão foi encontrado no conteúdo MDA (Gráfico 18B) no fígado em PN180 no grupo SL (+ 40% vs. NL, $p < 0,05$) e grupo SL-Ca (-21% vs. SL, $p < 0,05$).

Gráfico 18- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre marcadores de estresse oxidativo no fígado



Legenda: Adutos proteicos de 4HNE (A), conteúdo MDA (B), resíduos de proteínas 3-nitrotirosina (C), conteúdo de proteínas carboniladas (D) no fígado em PN120 e PN180. As bandas representativas são mostradas ao lado do gráfico. O conteúdo proteico de β -actina foi utilizado como controle. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * P <0,05 em relação NL; # P <0,05 em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.25 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a atividade de enzimas antioxidantes no plasma em PN120 e PN180

Em relação às avaliações no plasma (Tabela 9), em PN120, a atividade de CAT foi aumentada nos ratos SL (-109%, p <0,05). Atividade plasmática da GPx foi menor nos ratos SL em ambas as idades (PN120: -46% e PN 180: -68%, p <0,05). Proporção plasma SOD / GPx foi aumentada nos ratos SL em PN120 (+116%, p <0,05) e PN180 (+132%, p <0,05), e a suplementação de cálcio durante dois meses foi capaz de inverter este parâmetro. Em

PN180, a razão SOD plasma / (GPx + CAT) foi maior nos ratos SL do que no grupo NL (+ 115%, $p < 0,05$), e o grupo SL-Ca apresentou valores semelhantes aos controles.

Tabela 9 - Atividade das enzimas antioxidantes no plasma em PN120 e PN180.

| | PN120 | | | PN180 | | | |
|---------------------|--------------|--------------|----------|--------------|--------------|-------------------------|----------|
| | NL | SL | <i>p</i> | NL | SL | SL-Ca | <i>p</i> |
| SOD (U/mg proteína) | 663.8 ± 37.7 | 661.5 ± 17.5 | 0.96 | 496.7 ± 21.9 | 502.6 ± 16.6 | 498.3 ± 23.4 | 0.98 |
| GPx (U/mg proteína) | 0.4 ± 0.1 | 0.2 ± 0.1* | 0.01 | 0.7 ± 0.1 | 0.2 ± 0.1* | 0.4 ± 0.1 | 0.007 |
| CAT (U/mg proteína) | 0.03 ± 0.01 | 0.07 ± 0.01* | 0.02 | 0.07 ± 0.01 | 0.04 ± 0.01 | 0.04 ± 0.01 | 0.21 |
| SOD/GPx | 1522 ± 183 | 3295 ± 495* | 0.004 | 1168 ± 261 | 2715 ± 524* | 1385 ± 299 [#] | 0.02 |
| SOD/(GPx+CAT) | 1404 ± 185 | 3430 ± 899 | 0.04 | 945 ± 182 | 2036 ± 441* | 1145 ± 211 | 0.04 |

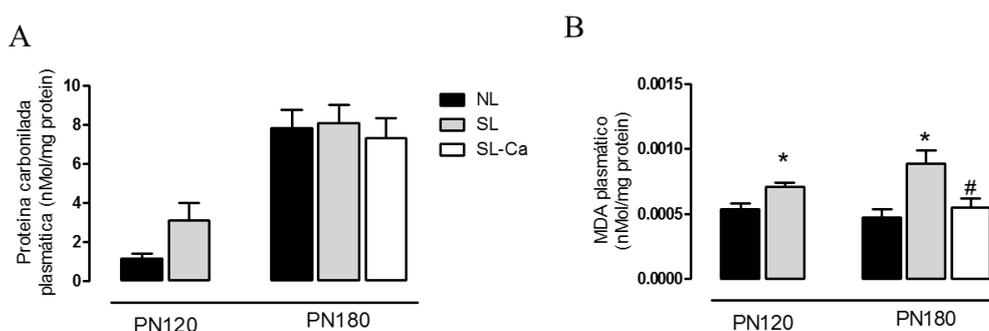
Nota: Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180. SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase; CAT, catalase. Resultados expressos como ± EPM de 10 ratos por grupo. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$; * vs. NL e # vs. SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.26 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a marcadores de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica no plasma

No plasma nenhuma alteração do conteúdo de proteínas carboniladas entre os grupos em ambas as idades (Gráfico 19A). No entanto, os ratos SL apresentam maior conteúdo de MDA no plasma em ambas as idades (PN120: + 32%, PN180: + 87%, $P < 0,05$, Gráfico 19B) e a suplementação com cálcio foi capaz de normalizar esta mudança.

Gráfico 19- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre marcadores de estresse oxidativo no plasma



Legenda 19. Conteúdo de proteína carbonilada (A) e de MDA (B) no plasma em PN120 e PN180. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

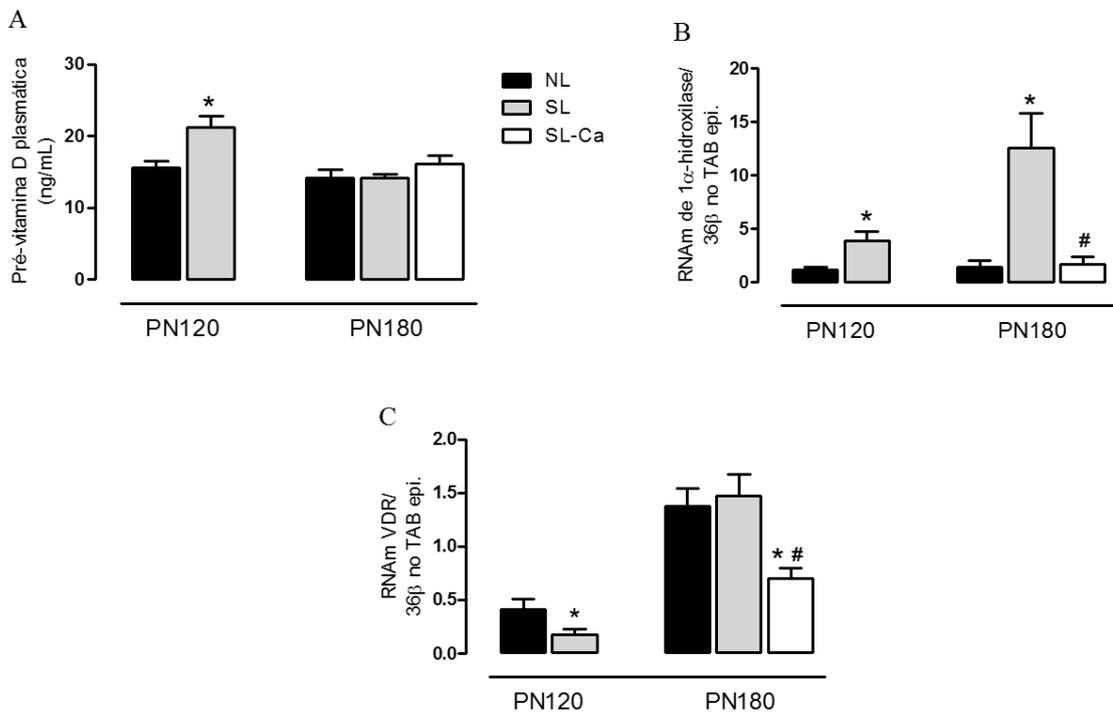
Fonte: A autora, 2016.

3.27 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre o metabolismo e ação da vitamina D no TAB epididimal

A concentração plasmática de 25 (OH) D foi elevada no grupo de SL em comparação com o grupo de NL-se apenas em PN120 (+ 36% vs NL; $p = 0,009$, Gráfico 20A). A expressão hidroxilase RNAm 1-alfa no TAV foi maior nos ratos SL do que nos NL em ambas as idades (PN120: 2,3 vezes; PN180: 7 vezes; $p < 0,05$ em ambas as comparações), e a

suplementação de cálcio normalizou esta alteração (-87% vs. SL; $p < 0,001$ Gráfico 20B). A expressão do RNAm VDR no TAV foi menor no grupo de SL do que no grupo em NL PN120 (-57%, $p = 0,03$ Gráfico 20C.) e sem alteração em PN180. O grupo SL-Ca tiveram uma diminuição na expressão de VDR RNAm comparado com os grupos NL e SL (-50% e -55%, respectivamente; $P < 0,05$ em ambas as comparações, Gráfico 20C) a suplementação com cálcio reverteu essa alteração (-35 % vs. SL; $p = 0,015$ Gráfico 20B).

Gráfico 20- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre o metabolismo e ação da vitamina D



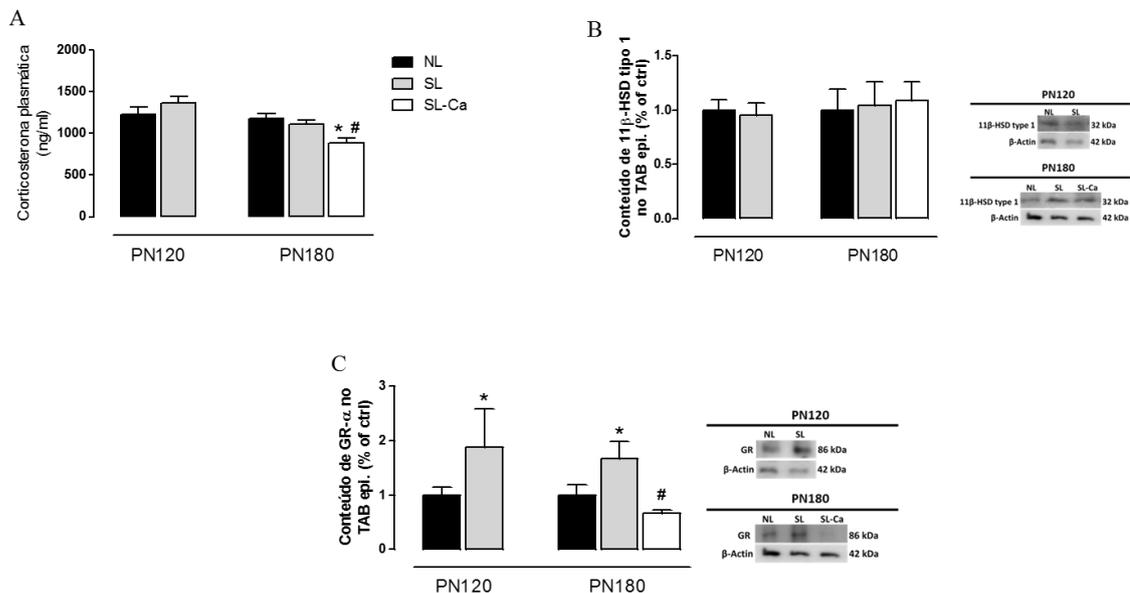
Legenda 20. Pré-vitamina D plasmática (A) e RNAm da 1α -hidroxilase (B) e VDR (C). Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.28 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre o metabolismo e ação da corticosterona no TAB epididimal

A concentração total de corticosterona no plasma foi reduzida em ratos SL-Ca na PN180 (-25% vs. NL; -20% vs. SL; $p < 0,05$ em ambas as comparações, Gráfico 21A.). O conteúdo proteico de 11 β -HSD1 no TAV não foi diferente entre os grupos em ambas as idades (Gráfico 21B). O conteúdo proteico do receptor alfa de glicocorticóides (GR-alfa) no TAV foi aumentado no grupo de SL em PN120 e em PN180 (+ 87% e + 67%, respectivamente, $p < 0,05$). A suplementação com cálcio normaliza a expressão GR-alfa (-60% vs. SL; $p = 0,012$ Gráfico 21C).

Gráfico 21- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre o metabolismo e ação da corticosterona



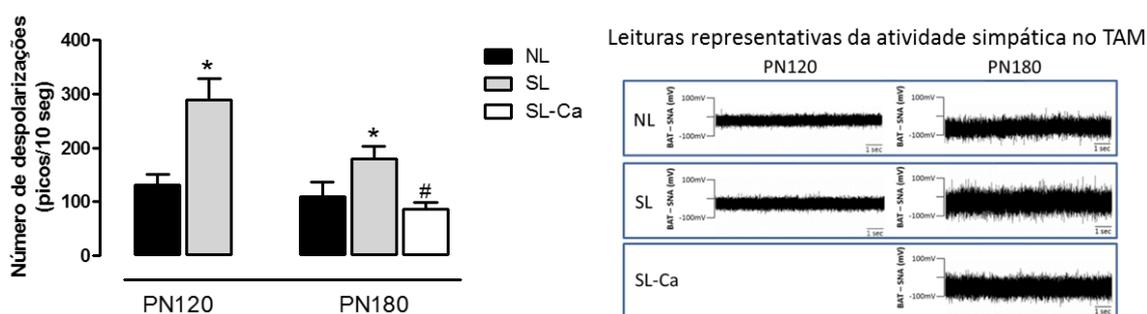
Legenda 21. Corticosterona plasmática (A), 11 β HSD tipo 1 (B) e GR α (C). Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.29 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre o TAM

Em ambas as idades (Gráfico 22), os ratos SL apresentaram maior atividade do nervo simpático que inerva o TAM em comparação ao grupo de NL, indicado pelo aumento do número de picos em 10 segundos (PN120: + 122%; $p = 0,006$; PN180: 63 %; $p = 0,03$). Dois meses de suplementação com cálcio foram capazes de normalizar a atividade do nervo simpático no grupo SL-Ca (Gráfico 22).

Gráfico 22- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a inervação do TAM



Legenda 22. Leituras representativas abaixo do gráfico. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

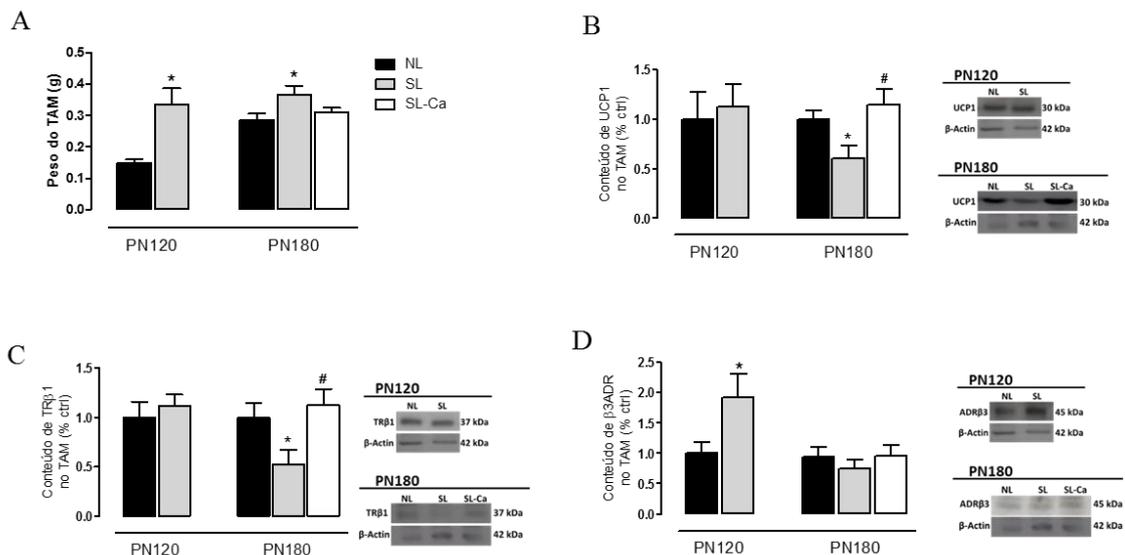
A massa do TAM (Gráfico 23A) foi aumentada em ratos SL quando em comparação aos ratos NL (PN120: 1,2 vezes de aumento, $p = 0,002$ PN180: + 24%; $p = 0,05$). A suplementação de cálcio durante dois meses, foi capaz de normalizar a massa do TAM (Gráfico 23A) no grupo SL-Ca.

Em PN120, o conteúdo proteico de UCP1 (Gráfico 23B) não foi afetado no grupo SL, enquanto que em PN180, o seu conteúdo foi menor nos ratos SL quando em comparação aos ratos NL (-40%; $p = 0,02$). A suplementação de cálcio durante dois meses, foi capaz de o conteúdo de UCP1 (Gráfico 23B) no grupo SL-Ca.

Em PN120, o conteúdo proteico de $\beta 3$ ADR (Gráfico 23C) foi maior no SL animais quando comparados ao grupo NL (+ 92%; $p = 0,05$). No entanto, em PN180, não se observou qualquer diferença entre estes grupos.

Em PN120, o conteúdo proteico de TR β 1 (Gráfico 23D) não foi afetada no grupo SL, enquanto, ao PN180, o seu conteúdo foi reduzido nos ratos SL quando em comparação com ratos NL (-48%, $p = 0,02$). A suplementação de cálcio durante dois meses, foi capaz de normalizar o conteúdo de TR β 1 (Gráfico 23D) no grupo SL-Ca.

Gráfico 23- . O efeito da suplementação dietética com cálcio na expressão proteica no TAM



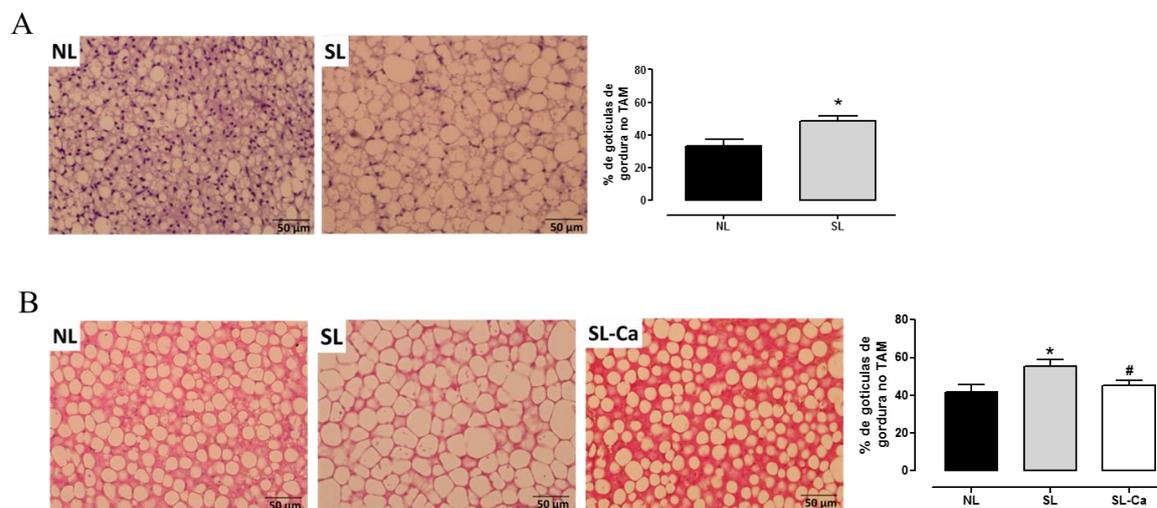
Legenda 23: Peso do TAM (A), conteúdos proteicos de UCP1 (B), TR β 1 (C) e ADR β 3 (D). As bandas representativas são mostradas ao lado do gráfico. O conteúdo proteico de β -actina foi utilizado como controle. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.30 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a histologia do TAM

Em ambas as idades (Gráficos 24), os ratos SL mostraram maior área de tecido ocupada por gotículas lipídica no TAM do que o grupo NL (PN120.: + 45%; $p = 0,04$ PN180: + 33%; $p = 0,03$). Dois meses de tratamento com cálcio foram capazes de reduzir o tamanho das gotículas de lipídio (Gráfico 24).

Gráfico 24- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a histologia do TAM



Legenda 24. Fotomicrografia representativa em PN120 (60x) e porcentagem da área ocupada por gotículas de lipídios em PN120 (A). Fotomicrografia representativa em PN180 (60x) e porcentagem da área ocupada por de gotículas de lipídios em PN180 (B). Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * P <0,05 em relação NL; # P <0,05 em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.31 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a sinalização hipotalâmica de regulação da atividade simpática

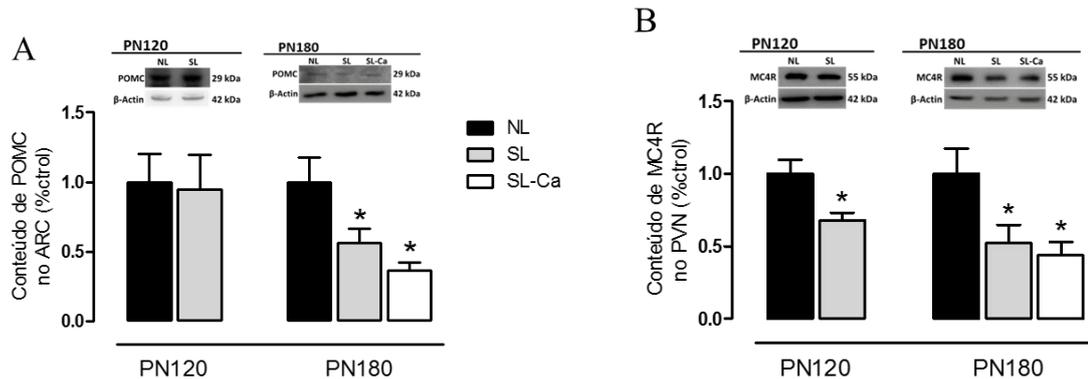
Em PN120, teor de proteína POMC (Gráfico 25A) no ARC não foi alterado no grupo SL, embora, no PN180, o seu conteúdo foi menor nos ratos SL do que nos NL (-44%; p = 0,006).

Em ambas as idades, conteúdo proteico de MC4R (Gráfico 25B) no PVN foi reduzido no grupo SL quando comparado ao NL (PN120: -32%, p <0,01 PN180: -48%, P <0,01). Dois meses de suplementação de cálcio não reverteu conteúdos POMC e MC4R no grupo SL-Ca. Em PN120 o conteúdo de POMC (Gráfico 25A) no ARC não foi alterado no grupo SL. Entretanto em PN180, o seu conteúdo foi menor em SL do que no grupo NL (-44%; p = 0,006).

Tanto em PN120 quanto em PN180 o conteúdo proteico MC4R (Gráfico 25B) no PVN foi reduzido no grupo SL quando comparados ao NL (PN120: -32%, p <0,01 PN180: -

48%, $P < 0,01$). Dois meses de suplementação com cálcio não reverteram conteúdos POMC e MC4R no grupo SL-Ca.

Gráfico 25- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre reguladores da atividade simpática do TAM



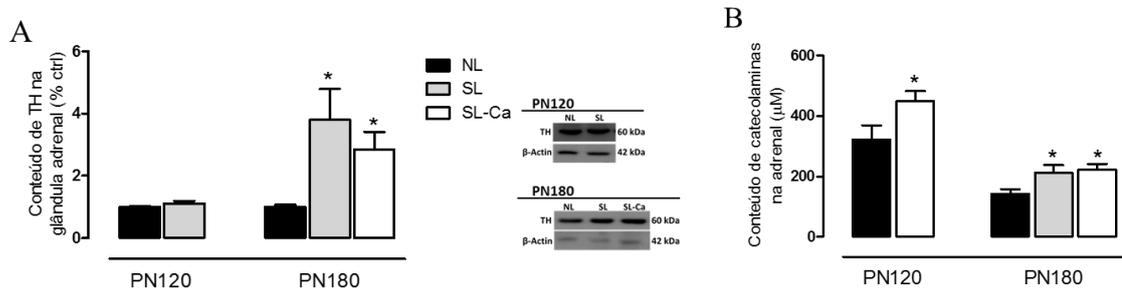
Legenda 25. Conteúdo de POMC no ARC (A) e conteúdo de MC4R no PVN (B). As bandas representativas são mostradas ao lado do gráfico. O conteúdo proteico de β -actina foi utilizado como controle. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.32 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre a função simpatoadrenal

Em PN120, teor de proteína TH (Gráfico 26A) não foi afetado no grupo SL, mas em PN180, o seu conteúdo foi maior nos ratos SL do que no grupo NL (+ 98%; $p = 0,005$). Em ambas as idades, conteúdo total de catecolaminas (Gráfico 26B) na glândula adrenal foi maior no SL animais quando comparados aos NL (PN120: + 47%; $p < 0,01$ PN180: + 49%; $p < 0,01$) a terapia com cálcio não foi capaz de restaurar o conteúdo de TH e de catecolaminas no grupo SL-Ca.

Gráfico 26- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre a função simpatoadrenal



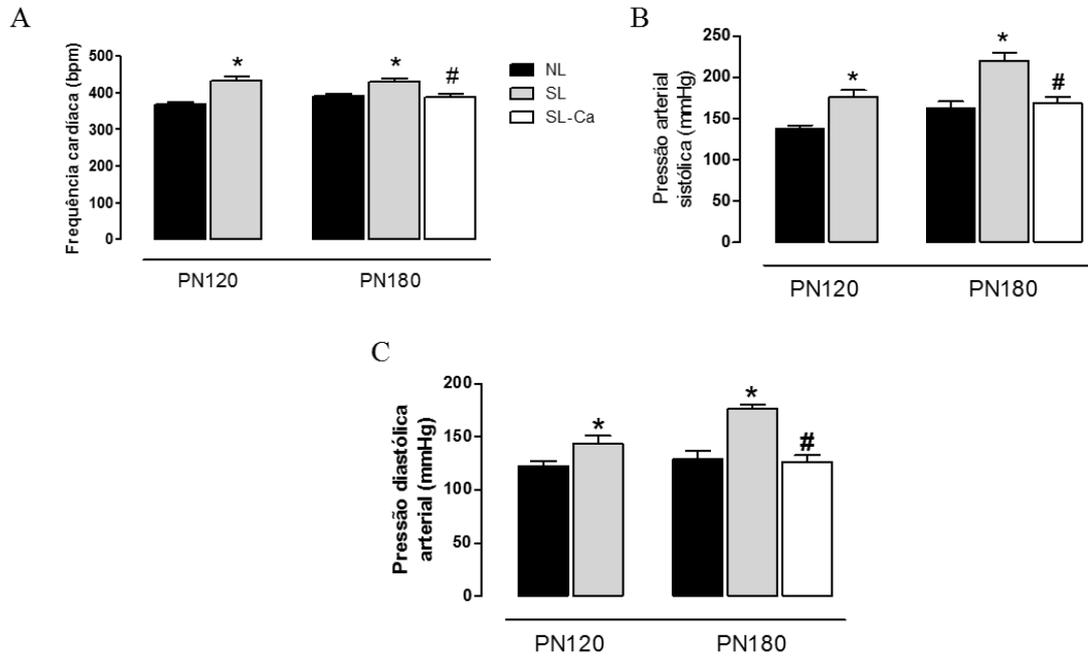
Legenda 26. Conteúdo de TH (A) e conteúdo de catecolaminas adrenais (B). As bandas representativas são mostradas ao lado do gráfico. O conteúdo proteico de β -actina foi utilizado como controle. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

3.33 Efeitos de uma dieta rica em cálcio sobre parâmetros cardiovasculares

A frequência cardíaca foi maior no grupo SL quando comparada com a do grupo de NL em ambas as idades (PN 119: + 17%; $P < 0,001$ PN179: + 10%; $P < 0,002$, Gráfico 27A). Além disso, tanto sistólica (PN120: + 28%; $p < 0,0027$ PN180: + 35%; $p < 0,0001$; Gráfico 27B) e quanto a diastólica (PN 119: + 17%; $p = 0,04$ PN179: + 37%; $P < 0,001$. Gráfico 27C) foram maiores em ratos SL do que nos NL. Dois meses de suplementação de cálcio foram capazes de reverter essas alterações (Gráficos 27A-27C).

Gráfico 27- O efeito da suplementação dietética com cálcio sobre parâmetros cardiovasculares



Legenda 27. Frequência cardíaca (A), pressão arterial sistólica (B) e pressão arterial diastólica (C). Ratos criados em ninhadas normais (NL) e em ninhadas pequenas (SL) durante a lactação e ratos de ninhadas pequenas que receberam suplementação com cálcio de PN120 a PN180 (SL-Ca). Os valores representam a média \pm SEM de 6-10 ratos por grupo. PN120 foi analisada pelo teste não pareado t de Student; PN180 foi analisada por ANOVA de uma via com Newman-Keuls para comparações múltiplas de teste. * $P < 0,05$ em relação NL; # $P < 0,05$ em relação SL.

Fonte: A autora, 2016.

4 DISCUSSÃO

Esta Tese foi organizada sob a forma de 5 artigos, nos quais estudamos o impacto da obesidade causada pela superalimentação neonatal, assim como o efeito de dois meses de oferta de uma dieta rica em cálcio para os animais programados sobre a adiposidade central e diversos outros parâmetros neuro-endócrino-metabólicos. Nestes trabalhos, passamos a conhecer melhor o fenótipo do animal e descrevemos a associação entre vários parâmetros disfuncionais, com o objetivo de ampliar a compreensão a respeito da gênese da síndrome metabólica associada a este modelo experimental. Baseados, portanto nas discussões de cada artigo em particular, apresentamos nossas considerações finais sobre a relevância e interdependência de cada artigo e as limitações desta Tese.

No artigo 1 evidenciamos que a superalimentação pós-natal resulta já ao desmame em aumento da capacidade lipogênica dos adipócitos associada a redução da sensibilidade as catecolaminas, favorecendo o aumento da gordura visceral. Também encontramos aumento da capacidade lipogênica no fígado. Observamos o estabelecimento precoce de um estado pró-oxidante no fígado e no plasma, que pode ser a causa da disfunção hepática e da maior adiposidade observadas em curto e longo prazo neste modelo.

No artigo 2, que é uma continuação direta do artigo acima, caracterizamos que uma dieta rica em cálcio por 2 meses, de PN120 a 180, é capaz de melhorar o estresse oxidativo tanto no fígado quanto no plasma na vida adulta de ratos que foram superalimentados na lactação, associado a normalização hepática da sensibilidade a insulina e da microesteatose.

Já no artigo 3, tentamos explicar do ponto de vista mecanicístico, como o cálcio poderia atuar, através de modificações no metabolismo da vitamina D e dos glicocorticóides no tecido adiposo. Propusemos que os animais programados pela superalimentação neonatal apresentam resistência a vitamina D no tecido adiposo e maior sensibilidade aos glicocorticóides na idade adulta, o que pode ser a causa da maior adiposidade visceral. A suplementação com cálcio na dieta é importante para corrigir em parte essas alterações.

Uma vez que a suplementação com cálcio dietético melhorou a adiposidade dos animais programados pela superalimentação em parte por influenciar a ação da vitamina D e de GC no tecido adiposo branco visceral, é possível que esta associação também ocorra em outros tecidos. Assim, seria interessante avaliar as enzimas conversoras e os receptores para estes dois hormônios, por exemplo, no TAM focando na termogênese e no fígado focando nos processos de lipogênese, gliconeogênese e glicogenólise.

No artigo 4 observamos que outro mecanismo pelo qual a suplementação com cálcio é capaz de melhorar o metabolismo de ratos superalimentados na lactação é pelo aumento da capacidade termogênica do tecido adiposo marrom (TAM), que exibe maior sensibilidade aos hormônios tireoidianos e melhor resposta a ativação simpática. Apesar da hiperfunção simpatoadrenal não ter sido normalizada pela suplementação com cálcio, esta dieta foi capaz de restaurar a pressão arterial e a frequência cardíaca dos animais programados. No presente estudo, evidenciamos também que esses efeitos foram independentes da sinalização ativada pelo POMC/MC4R.

Finalmente, no artigo 5 verificamos que a hiperfagia persistente dos ratos SL está relacionada a redução do sistema de recompensa cerebral (via dopaminérgica mesocorticolímbica). Além disto, estes animais quando submetidos a um desafio alimentar, mostram uma preferência por dieta hiperlipídica. A suplementação é capaz de reduzir o consumo alimentar, que pode ser pela melhora da sensibilidade a dopamina no do núcleo arqueado hipotalâmico e/ou pela redução do conteúdo do NPY, além de ter revertido a preferência pela dieta rica em gordura.

Abaixo, sucintamente, teceremos alguns comentários quanto as limitações observadas no presente trabalho:

A falta da avaliação do conteúdo e/ou atividade das enzimas geradoras de EROs tanto ao desmame quanto na idade adulta pode ser considerada uma limitação dos artigos 1 e 2, pois assim teríamos uma boa ideia quanto a fonte responsável pelo dano oxidativo no modelo de superalimentação e, desta forma, e poderíamos sugerir terapias antioxidantes mais específicas.

Para entender melhor o papel da suplementação com cálcio sobre o consumo alimentar, seria importante ter um grupo SL pair-fed correndo em paralelo ao grupo SL-Ca, para descartar o efeito da redução do consumo energético observado nestes animais. Também seria interessante avaliar o sistema dopaminérgico imediatamente após o teste de preferência pela dieta palatável (30 min e 12h).

No artigo 3, a principal limitação é não termos dosado a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ plasmática e intracelular. Ainda, a realização de um estudo *in vitro* com os adipócitos primários provenientes de animais supernutridos ajudaria a entender o comportamento dessas células frente a administração de $25(\text{OH})\text{D}$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e dexametasona. Finalmente, diante do achado de hipocorticosteronemia do grupo SL-Ca, seria importante avaliar o eixo hipotálamo-hipófise-córtex adrenal, através da dosagem de CRH hipotalâmico e ACTH hipofisário (por Western blot, IHC ou PCR), assim como o ACTH sérico por ELISA.

Apesar das observações acima, o conjunto dos nossos achados destacam o impacto metabólico resultante da suplementação dietética com cálcio, que pode ter um papel nutricional promissor para auxiliar a perda de peso e minimizar os distúrbios relacionados a obesidade e a síndrome metabólica, independente da origem.

REFERÊNCIAS

1. Adamczak M, Wiecek A. The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin Nephrol.* 2013 Jan;33(1):2-13. doi: 10.1016/j.semnephrol.2012.12.008.
2. Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion – implications for health and disease. *Diabetologia* 2000; 43: 393–410.
3. Aiston S, Agius L. Leptin enhances glycogen storage in hepatocytes by inhibition of phosphorylase and exerts an additive effect with insulin. *Diabetes.* 1999; 48:15-20.
4. Alfaradhi MZ, Ozanne SE. Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Front Genet.* 2011 Jun 3;2:27. doi: 10.3389/fgene.2011.00027. eCollection 2011.
5. Alvarez GE1, Halliwill JR, Ballard TP, Beske SD, Davy KP. Sympathetic neural regulation in endurance-trained humans: fitness vs. fatness. *J Appl Physiol* (1985). 2005 Feb;98(2):498-502. Epub 2004 Oct 15.
6. Amann JF, Constantinescu GM. The anatomy of the visceral and autonomic nervous systems. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 1990 Feb;5(1):4-11.
7. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 2004;55:373-99.
8. Ardawi MS, Sibiany AM, Bakhsh TM, Qari MH, Maimani AA. High prevalence of vitamin D deficiency among healthy Saudi Arabian men: relationship to bone mineral density, parathyroid hormone, bone turnover markers, and lifestyle factors. *Osteoporos Int.* 2012 Feb;23(2):675-86.
9. Ardawi, M.S., Qari, M.H., Rouzi, A.A., Maimani, A.A., Raddadi, R.M. Vitamin D status in relation to obesity, bone mineral density, bone turnover markers and vitamin D receptor genotypes in healthy Saudi pre- and postmenopausal women. *Osteoporos International* 2011, 22, 463-75.
10. Baltatzi M, Hatzitolios A, Tziomalos K, Iliadis F, Zamboulis Ch. Neuropeptide Y and alpha-melanocyte-stimulating hormone: interaction in obesity and possible role in the development of hypertension. *International journal of clinical practice.* 2008; 62:1432-40.
11. Barbe P, Millet L, Galitzky J, Lafontan M, Berlan M. In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *British journal of pharmacology.* 1996; 117:907–13.
12. Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, Baroni MG, Pozzilli P, Morini S, Cavallo MG. Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC Med.* 2011 Jul 12;9:85.

13. Barker DJP. The developmental origins of adult disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 2004; 23:588S-595S.
14. Barnes P, Jacobs M, Roberts JM. Glucocorticoids preferentially increase fetal alveolar beta-adrenoreceptors: autoradiographic evidence. *Pediatr Res*. 1984 Nov;18(11):1191-4.
15. Batsis JA, Romero-Corral A, Collazo-Clavell ML et al. Effect of weight loss on predicted cardiovascular risk: Change in cardiac risk after bariatric surgery. *Obesity*. 2007; 15:772–84,.
16. Bei F, Jia J, Jia YQ, Sun JH, Liang F, Yu ZY, Cai W. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids Health Dis*. 2015 Aug 26;14:96.
17. Beilin L, Huang R-C. Childhood obesity, hypertension, the metabolic syndrome and adult cardiovascular disease. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2008; 35:409-11.
18. Bhatt SP1, Nigam P, Misra A, Guleria R, Qadar Pasha MA. Independent associations of low 25 hydroxy vitamin D and high parathyroid hormonal levels with nonalcoholic fatty liver disease in Asian Indians residing in north India. *Atherosclerosis*. 2013 Sep;230(1):157-63.
19. Bikle DD. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem Biol*. 2014 Mar 20;21(3):319-329.
20. Blaak EE, Van Baak MA, Kemerink GJ, Pakbiers MT, Heidendal GA, Saris WH. beta-Adrenergic stimulation of skeletal muscle metabolism in relation to weight reduction in obese men. *The American journal of physiology*. 1994; 267: E316–22.
21. Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:1553-1567.
22. Blum K, Thanos PK, Gold MS. Dopamine and glucose, obesity, and reward deficiency syndrome. *Front Psychol*. 2014 Sep 17;5:919.
23. Bonomo IT, Lisboa PC, Pereira AR, Passos MC, de Moura EG. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *The Journal of endocrinology*. 2007; 1922:339-44.
24. Bougneres P, Stunff CL, Pecqueur C, Pinglier E, Adnot P, Ricquier D. In vivo resistance of lipolysis to epinephrine. A new feature of childhood onset obesity. *The Journal of clinical investigation*. 1997; 99:2568–73.
25. Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2005; 54:197-203.
26. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*. 2004; 304:108-10.

27. Bouret SG, Simerly RB. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clinical genetics*. 2006; 70:295-301.
28. Bouret SG. Development of hypothalamic neural networks controlling appetite. *Forum of nutrition*. 2010; 63:84-93.
29. Brasaemle DL, Subramanian V, Garcia A, Marcinkiewicz A, Rothenberg A: Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Molecular Cell Biochemistry*. 2009; 326:15-21.
30. Bray GA, Fisler J, York DA. Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. *Front Neuroendocrinol*. 1990; 11:128-181.
31. Breton, C. (2013). The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. *The Journal of Endocrinology*, 216(2), R19–31.
32. Byrne CD. Ectopic fat, insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. *Proc Nutr Soc*. 2013 Nov;72(4):412-9.
33. Chang E, Donkin SS, Teegarden D. Parathyroid hormone suppresses insulin signaling in adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Aug 13;307(1-2):77-82.
34. Chaves VE, Frasson D, Kawashita NH. Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes. *Biochimie*. 2011 Oct;93(10):1631-40.
35. Chesi A, Grant SF. The Genetics of Pediatric Obesity. *Trends Endocrinol Metab*. 2015 Dec;26(12):711-21.
36. Clare Grace PD, Vincent R, Aylwin SJ. High prevalence of vitamin D insufficiency in a United Kingdom urban morbidly obese population: Implications for testing and treatment. *Surg Obes Relat Dis*. 2014 Mar-Apr;10(2):355-60.
37. Cohen M, Syme C, Deforest M, Wells G, Detzler G, Cheng HL, McCrindle B, Hanley A, Hamilton J. Ectopic fat in youth: The contribution of hepatic and pancreatic fat to metabolic disturbances. *Obesity (Silver Spring)*. 2013 Dec 4.
38. Conceição EP, Franco JG, Oliveira E, Resende AC, Amaral TA, Peixoto-Silva N, Passos MC, Moura EG, Lisboa PC. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition--role of insulin resistance. *J Nutr Biochem*. 2013 Jan;24(1):81-7.
39. Conceição EP, Moura EG, Carvalho JC, Oliveira E, Lisboa PC. Early redox imbalance is associated with liver dysfunction at weaning in overfed rats. *J Physiol*. 2015 Nov 1;593(21):4799-811.
40. Conceição EP, Trevenzoli IH, Oliveira E, Franco JG, Carlos AS, Nascimento-Saba CC et al., Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. *Hormone and metabolic research*. 2011; 43:513–516.

41. Conceição EP, Trevenzoli IH, Oliveira E, Franco JG, Carlos AS, Nascimento-Saba CC, Moura EG, Lisboa PC. Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. *Horm Metab Res*. 2011 Jun;43(7):513-6.
42. Cunha AC, Pereira RO, Pereira MJ, Soares Vde M, Martins MR, Teixeira MT et al., Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2009; 20:435-42.
43. Davidowa H & Plagemann A. Inhibition by insulin of hypothalamicVMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. *Neuroreport*. 2001; 12:3201–3204.
44. Davidowa H and Plagemann A. Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. *Neuroreport*, 2000; 11: 2795–2798.
45. Davidowa H, Li Y, Plagemann A. Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons of normal and postnatally overnourished rats differ in their responses to melanin-concentrating hormone. *Regulatory peptides*. 2002; 108;103–111.
46. de Albuquerque Maia L, Lisboa PC, de Oliveira E, da Conceição EP, Lima IC, Lopes RT, Ruffoni LD, Nonaka KO, de Moura EG. Bone structure and strength are enhanced in rats programmed by early overfeeding. *Horm Metab Res*. 2014 Apr;46(4):259-68.
47. de Almeida DL, Fabrício GS, Trombini AB, Pavanello A, Tófolo LP, da Silva Ribeiro TA, de Freitas Mathias PC, Palma-Rigo K. Early overfeed-induced obesity leads to brown adipose tissue hypoactivity in rats. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32(6):1621-30.
48. de Diego AM, Gandía L, García AG. A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiology (Oxf)*. 2008; 192:287-301.
49. de Moura EG, Lisboa PC, Passos MC. Neonatal programming of neuroimmunomodulation - role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation*. 2008; 15:176-88.
50. Douglas WW & Poisner AM. On the mode of action of acetylcholine in evoking adrenal medullary secretion: increased uptake of calcium during the secretory response. *Journal Physiology*. 1962; 162: 385–392.
51. Douglas WW & Poisner AM. Stimulation of uptake of calcium-45 in the adrenal gland by acetylcholine. *Nature*. 1961; 192:1299.
52. Du J, Fan LM, Mai A, Li JM. Crucial roles of Nox2-derived oxidative stress in deteriorating the function of insulin receptors and endothelium in dietary obesity of middle-aged mice. *Br J Pharmacol*. 2013 Nov;170(5):1064-77.
53. Dulloo AG. Biomedicine. A sympathetic defense against obesity. *Science*. 2002 Aug 2;297(5582):780-1.
54. Earthman CP, Beckman LM, Masodkar K, Sibley SD. The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. *Int J Obes* 2012; 36: 387–396.

55. Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol.* 1991 Feb;260(2 Pt 2):R328-34.
56. Ellis PJ, Morris TJ, Skinner BM, Sargent CA, Vickers MH, Gluckman PD, Gilmour S, Affara NA. Thrifty metabolic programming in rats is induced by both maternal undernutrition and postnatal leptin treatment, but masked in the presence of both: implications for models of developmental programming. *BMC Genomics.* 2014 Jan 21;15:49.
57. Enoksson S, Talbot M, Rife F, Tamborlane WV, Sherwin RS, Caprio S. Impaired in vivo stimulation of lipolysis in adipose tissue by selective beta2-adrenergic agonist in obese adolescent girls. *Diabetes.* 2000; 49:2149–53.
58. Feldberg W, Minz B, Tsudzimura H. The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *Journal of physiology.* 1934; 81, 286–304.
59. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2011;12(5):3117-32.
60. Finkelstein EA 2014 How big of a problem is obesity? *Surgery for Obesity and Related Diseases* 10 569-750.
61. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 Apr;50(2):216-29.
62. Geerling JJ, Boon MR, Kooijman S, et al. Sympathetic nervous system control of triglyceride metabolism: novel concepts derived from recent studies. *J Lipid Res.* 2014;55(2):180–189.
63. Gentile CL, Orr JS, Davy BM, Davy KP. Modest weight gain is associated with sympathetic neural activation in nonobese humans. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.* 2007; 292:R1834–8.
64. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental plasticity and human disease: research directions. *Journal of internal medicine.* 2007; 261:461-71.
65. Granneman JG, Moore HP, Granneman RL, Greenberg AS, Obin MS, Zhu Z. Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *The Journal of biological chemistry.* 2007; 282:5726–35.
66. Grant W. What is the optimal level of vitamin D? *Aust Fam Physician.* 2014 Oct;43(10):668, 670
67. Grant, W.B., Holick, M.F. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative Medicine Review.* 2005, 10, 94-111.
68. Grassi G. Sympathetic neural activity in hypertension and related diseases. *American journal of Hypertension.* 2010; 23:1052–60.

69. Grineva EN, Karonova T, Micheeva E, Belyaeva O, Nikitina IL. Vitamin D deficiency is a risk factor for obesity and diabetes type 2 in women at late reproductive age. *Aging (Albany NY)*. 2013 Jul;5(7):575-81.
70. Grouzmann E, Fathi M, Gillet M, Torrente A D, Cavadas C, Brunner H et al., Disappearance rate of catecholamines , total metanephrines , and neuropeptide y from the plasma of patients after resection of pheochromocytoma. *Clinical chemistry*. 2001; 47:1075-82.
71. Guebre-Egziabher F, Alix PM, Koppe L, Pelletier CC, Kalbacher E, Fouque D, Soulage CO. Ectopic lipid accumulation: A potential cause for metabolic disturbances and a contributor to the alteration of kidney function. *Biochimie*. 2013 Nov;95(11):1971-9.
72. Habib KE, Weld KP, Rice KC, Pushkas J, Champoux M, Listwak S, Webster EL, Atkinson AJ, Schulkin J, Contoreggi C, Chrousos GP, McCann SM, Suomi SJ, Higley JD & Gold PW (2000). Oral administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6079–60
73. Haemmerle G, Zimmermann R, Strauss JG, Schoiswohl G, Birner- Gruenberger R, Riederer M et al., Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*. 2004; 306:1383-1386.
74. Hall JE, Hildebrandt DA, Kuo J. Obesity hypertension: Role of leptin and sympathetic nervous system. *American journal of hypertension*. 2001; 14: 103S– 15S.
75. He F, Zuo L. Redox Roles of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2015 Nov 20;16(11):27770-80.
76. Heggeness FW, Diliberto J, and DiStefano V. Effect of growth velocity on cardiac norepinephrine content in infant rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1970; 133: 1413–1416.
77. Heidel E, Plagemann A, Davidowa H. Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. *Neuroreport*. 1999 Jun 23;10(9):1827-31.
78. Hilzendege AM, Morgan DA, Brooks L, Dellsperger D, Liu X, Grobe JL, Rahmouni K, Sigmund CD, Mark AL. A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Jul 15;303(2):H197-206.
79. Hodel A Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *Journal of neuroendocrinology*, 2001; 13:216–220,.
80. Hoffman BB, Taylor P. Neurotransmission. In: A. Goodman, A. Gilman, J.G. Hardman & L.E. Limbird (eds) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw- Hill, New York, 2001.
81. Jankovic A, Korac A, Buzadzic B, Otasevic V, Stancic A, Daiber A, Korac B. Redox implications in adipose tissue (dys)function-A new look at old acquaintances. *Redox Biol*. 2015 Dec;6:19-32.

82. Jenkins-Kruchten AE, Bennaars-Eiden A, Ross JR, Shen WJ, Kraemer FB, Bernlohr DA. Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278: 47636–43.
83. Jocken JW, Goossens GH, van Hees AM, Frayn KN, van Baak M, Stegen J, et al. Effect of beta-adrenergic stimulation on whole-body and abdominal subcutaneous adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *Diabetologia*. 2008a; 51:320–7.
84. Jocken JWE, Blaak EE. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiology and Behavior*. 2008b; 94: 219–230.
85. Kalil GZ, Haynes WG. Sympathetic nervous system in obesity-related hypertension: mechanisms and clinical implications. *Hypertension research*. 2012; 35:4-16.
86. Kallwitz ER, McLachlan A, Cotler SJ. Role of peroxisome proliferators-activated receptors in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 7;14(1):22-8.
87. Khanh DV, Choi YH, Moh SH, Kinyua AW, Kim KW. Leptin and insulin signaling in dopaminergic neurons: relationship between energy balance and reward system. *Front Psychol*. 2014; 846: 1-7.
88. Kong J, Li YC. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E916–924.
89. Kuhar M J, Couceyro P R, Lambert P D, Catecholamines, In *Basic Neurochemistry - Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Lippincott Williams and Wilkins, 1999.
90. Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in lipid research*. 2009; 48:275–97.
91. Langley-Evans SC. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *J Hum Nutr Diet*. 2015; 28: 1-14.
92. Lau C, Seidler FJ, Cameron AM, Navarro HA, Bell JM, Bartolome J et al. Nutritional influences on adrenal chromaffin cell development: comparison with central neurons. *Pediatric research*. 1988; 24:583-7.
93. Leal Vde O, Mafra D. Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta*. 2013 Apr 18;419:87-94.
94. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(8):1067-75.
95. Leclercq, I. A., Farrel, G. C., Field, J., Bell, D. R., Gonz´alez, F. J. and Robertson, G. R. (2000) CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Invest.* 105, 1067–1075
96. Li Y, Plagemann A, Davidowa H. Increased inhibition by agouti-related peptide of ventromedial hypothalamic neurons in rats overweight due to early postnatal overfeeding. *Neuroscience letters*. 2002; 330: 33–36.

97. Liatis S, Tentolouris N, Katsilambros N. Cardiac autonomic nervous system activity in obesity. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2004 Aug;1 Suppl 3:476-83
98. Lima Nda S, de Moura EG, Passos MC, Nogueira Neto FJ, Reis AM, de Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. *The British journal of nutrition.* 2011; 105:1405-13.
99. Lippert RN, Ellacott KL, Cone RD. Gender-specific roles for the melanocortin-3 receptor in the regulation of the mesolimbic dopamine system in mice. *Endocrinology.* 2014; 5: 1718-1727.
100. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006
101. López-Velázquez JA, Silva-Vidal KV, Ponciano-Rodríguez G, Chávez-Tapia NC, Arrese M, Uribe M, Méndez-Sánchez N. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Ann Hepatol.* 2014 Mar-Apr;13(2):166-78.
102. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation symposium.* 1991; 156, 38–50.
103. Ma Y, Nyman JS, Tao H, Moss HH, Yang X, Eleftheriou F. β 2-Adrenergic receptor signaling in osteoblasts contributes to the catabolic effect of glucocorticoids on bone. *Endocrinology.* 2011 Apr;152(4):1412-22.
104. Malloy PJ, Feldman BJ. Cell-autonomous regulation of brown fat identity gene UCP1 by unliganded vitamin D receptor. *Mol Endocrinol.* 2013 Oct;27(10):1632-42. doi: 10.1210/me.2013-1037. Epub 2013 Aug 1.
105. Marsh AJ, Fontes MA, Killinger S, Pawlak DB, Polson JW & Dampney RA. Cardiovascular responses evoked by leptin acting on neurons in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus. *Hypertension.* 2003; 42:488–493.
106. Martins AC, Souza KL, Shio MT, Mathias PC, Lelkes PI, Garcia RM. Adrenal medullary function and expression of catecholamine-synthesizing enzymes in mice with hypothalamic obesity. *Life sciences.* 2004; 74: 3211–3222.
107. Martins MR, Vieira AK, de Souza EP, Moura AS. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. *Journal of Endocrinology.* 2008; 198:591-598.
108. Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract.* 2013 Sep-Oct;7(5):e330-41.
109. McGarry JD & Brown NF 1997 The mitochondrial carnitine palmitoyl- transferase system. From concept to molecular analysis. *European Journal of Biochemistry* 244 1–14
110. Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, Priolella A, Salomone E, Pontecorvi A, Giaccari A. Vitamin D deficiency: a new risk factor for type 2 diabetes?. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(4):337-48.

111. Mitchell P., Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature* 191 (1961) 144–148.
112. Monteiro CA, Benicio MH, Conde WL, Popkin BM. Shifting obesity trends in Brazil. *European journal of clinical nutrition*. 2000; 54:342-6.
113. Moreira AS, Teixeira M, da Silveira Osso F, Pereira RO, de Oliveira Silva-Junior G et al., Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases*. 2009; 19:805-10.
114. Morgan DA, Rahmouni K. Differential effects of insulin on sympathetic nerve activity in agouti obese mice. *J Hypertens*. 2010 Sep;28(9):1913-9.
115. Morris KL, Zemel MB: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulation of adipocyte glucocorticoid function. *Obes Res* 2005, 13:670–677
116. Morris MJ, Hastings JA, Pavia JM. Central interactions between noradrenaline and neuropeptide Y in the rat: implications for blood pressure control. *Clinical and experimental hypertension*. 1997; 19:619–630.
117. Morris MJ, Velkoska E, Cole TJ. Central and peripheral contributions to obesity-associated hypertension: impact of early overnourishment. *Exp Physiol*. 2005;90(5):697–702.
118. Morris MJ. Cardiovascular and metabolic effects of obesity. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2008; 35:416-9.
119. Muntzel MS, Morgan DA, Mark AL, Johnson AK. Intracerebroventricular insulin produces nonuniform regional increases in sympathetic nerve activity. *American Journal of Physiology*. 1994; 267: R1350–R1355.
120. Nemezc M, Preininger K, Englisch R, Fürnsinn C, Schneider B, Waldhäusl W et al., Acute effect of leptin on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in perfused rat liver. *Hepatology*. 1999; 29:166-72.
121. Nimitphong H1, Holick MF, Fried SK, Lee MJ. 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. *PLoS One*. 2012;7(12):e52171.
122. Olney JW. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 1969; 164:719–721.
123. Omdahl JL, Morris HA, May BK. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:139-66
124. Passos M, Ramos CF & Moura EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition research*. 2000; 20:1603–1612.
125. Pekary AE, Sattin A, Blood J. Rapid modulation of TRH and TRH-like peptide release in rat brain and peripheral tissues by leptin. *Brain research*. 2010; 1345:9-18.

126. Pereira RO, Moreira AS, de Carvalho L, Moura AS. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signalling cascade in rats heart's. *Regulatory Peptides*. 2006; 136: 117-121.
127. Pheiffer C, Jacobs C, Patel O, Ghoor S, Muller C, Louw J. Expression of UCP2 in Wistar rats varies according to age and the severity of obesity. *J Physiol Biochem*. 2015 Nov 30.
128. Pilz S, Rutters F, Dekker JM. Disease prevention: vitamin D trials. *Science*. 2012 Nov 16;338(6109):883.
129. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X et al., Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*. 2004; 304:110-5.
130. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015 Jun 5;97:55-74.
131. Plagemann A, Harder T, Rake A, Waas T, Melchior K, Ziska T et al., Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 1999a; 11:541–546.
132. Plagemann A, Roepke K, Harder T, Brunn M, Harder A, Wittrock-Staar M et al., Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *Journal of perinatal medicine*. 2010; 38:393-400.
133. Plagemann A, Harder T, Janert U, Rake A, Rittel F, Rohde W & Dorner G. Malformations of hypothalamic nuclei in hyperinsulinemic offspring of rats with gestational diabetes. *Developmental neuroscience*. 1999b; 21:58–67.
134. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX et al., Obesity and cardiovascular disease: Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: An update of the American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2006; 113:898-918.
135. Portella AK, Silveira PP, Laureano DP, Cardoso S, Bittencourt V, Noschang C, Werlang I, Fontella FU, Dalmaz C, Goldani MZ. Litter size reduction alters insulin signaling in the ventral tegmental area and influences dopamine-related behaviors in adult rats. *Behav Brain Res*. 2015; 278: 66-73.
136. Potter JJ, Liu X, Koteish A, Mezey E. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor repress human alpha1 (I) collagen expression and type I collagen formation. *Liver Int* 2013; 33: 677–86.
137. Pucci G, Battista F, de Vuono S, Boni M, Scavizzi M, Ricci MA, Lupattelli G, Schillaci G. Pericardial fat, insulin resistance, and left ventricular structure and function in morbid obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013 Nov 1. pii: S0939-4753(13)00264-0.
138. Queiroz JC, Alonso-Vale MI, Curi R, Lima FB. Control of adipogenesis by fatty acids. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009 Jul;53(5):582-94.

139. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 6ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2004. p. 185.
140. Rayner DV, Trayhurn P. Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79(1):8-20.
141. RB, Sichieri R, Pontes Ndos S, Monteiro CA. Household food availability in Brazil: distribution and trends (1974-2003). *Revista de saúde pública*. 2005; 39:530-40.
142. Rector RS, Thyfault JP, Uptergrove GM, Morris EM, Naples SP, Borengasser SJ, Mikus CR, Laye MJ, Laughlin MH, Booth FW, Ibdah JA. Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. *J Hepatol*. 2010 May;52(5):727-36.
143. Reichelt AC, Westbrook RF, Morris MJ. Integration of reward signalling and appetite regulating peptide systems in the control of food-cue responses. *Br J Pharmacol*. 2015 Nov;172(22):5225-38.
144. Reilly JJ, Kelly J. Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review. *International Journal of Obesity (Lond)*. 2011; 35:891-8.
145. Reynolds CM, Gray C, Li M, Segovia SA, Vickers MH. Early Life Nutrition and Energy Balance Disorders in Offspring in Later Life. *Nutrients*. 2015 Sep 21;7(9):8090-111.
146. Ribeiro MO, Bianco SD, Kaneshige M, Schultz JJ, Cheng SY, Bianco AC, Brent GA. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*. 2010 Jan;151(1):432-40.
147. Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Trevenzoli IH, da Conceição EP, Bonono IT et al., Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2011; 22:109-17.
148. Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MCF, Dutra SCP, Lisboa PC. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *The Journal of physiology*. 2009; 587: 2647–2661.
149. Rodrigues AL, De Souza EP, Da Silva SV, Rodrigues DS, Nascimento AB, Barja-Fidalgo C, et al., Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *The Journal of endocrinology*. 2007; 195: 485–494.
150. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*. 2012 Jan 1;52(1):59-69
151. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:885–896.

152. Rosenstreich SJ, Rich C, Volwiler W. Deposition in and release of vitamin D₃ from body fat: evidence for a storage site in the rat. *J Clin Invest.* 1971 Mar;50(3):679-87.
153. Rosselli M, Lotersztajn S, Vizzutti F, Arena U, Pinzani M, Marra F. The Metabolic Syndrome and Chronic Liver Disease.
154. Roth CL, Elfers CT, Figlewicz DP, Melhorn SJ, Morton GJ, Hoofnagle A, Yeh MM, Nelson JE, Kowdley KV. Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation. *Hepatology.* 2012 Apr;55(4):1103-11.
155. Saito M. Brown adipose tissue as a therapeutic target for human obesity. *Obes Res Clin Pract.* 2013 Dec;7(6):e432-8.
156. Santos RD, Vianna LM. Effect of cholecalciferol supplementation on blood glucose in an experimental model of type 2 diabetes mellitus in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats. *J Clin Chim Acta.* 2005;358(1):146–150.
157. Scheurink a J, Balkan B, Strubbe JH, van Dijk G, Steffens a B. Overfeeding, autonomic regulation and metabolic consequences. *Cardiovascular drugs and therapy.* 1996; 1:263-73.
158. Schiffelers SL, Akkermans JA, Saris WH, Blaak EE. Lipolytic and nutritive blood flow response to beta-adrenoceptor stimulation in situ in subcutaneous abdominal adipose tissue in obese men. *International journal of obesity and related metabolic disorders.* 2003; 27:227–31.
159. Schrauwen-Hinderling V.B., M.E. Kooi, Schrauwen P., Mitochondrial function and diabetes; consequences for skeletal and cardiac muscle metabolism, *Antioxid. Redox Signal.* (2015) 10.1089/ars.2015.6291,
160. Sharabi K, Tavares CD, Rines AK, Puigserver P. Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Mol Aspects Med.* 2015
161. Shi, H., Norman, A. W., Okamura, W. H., Sen, A. & Zemel, M. B. (2001) 1,α,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates human adipocyte metabolism via non-genomic action. *FASEB J.* 15:2751-2753
162. Shimazu T, Fukuda A & Ban T. Reciprocal Influences of the Ventromedial and Lateral Hypothalamic Nuclei on Blood Glucose Level and Liver Glycogen Content *Nature* 210, 1178 - 1179 (11 June 1966).
163. Sierra-Johnson J, Romero-Corral A, Lopez-Jimenez F, Gami AS, Sert Kuniyoshi FH, Wolk R et al., Relation of increased leptin concentrations to history of myocardial infarction and stroke in the United States population. *The American journal of cardiology.* 2007; 100: 234–9.
164. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4C:180–183. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002.
165. Simon JJ, Skunde M, Hamze Sinno M, Brockmeyer T, Herpertz SC, Bendszus M, Herzog W, Friederich HC. Impaired cross-talk between mesolimbic food reward

- processing and metabolic signaling predicts body mass index. *Front Behav Neurosci.* 2014; 359: 1-10.
166. Slavin BG and Ballard KW. Morphological studies on the adrenergic innervation of white adipose tissue. *Anat Rec* 191: 377–389, 197
 167. Smith M. M. and Minson C.T., “Obesity and adipokines: effects on sympathetic overactivity,” *Journal of Physiology*, vol.590,no. 8, pp. 1787–1801, 2012.
 168. Soares VM, Garcia-Souza EP, Lacerda-Miranda G, Moura AS. Early life overfeeding decreases acylated ghrelin circulating levels and upregulates GHSR1a signaling pathway in white adipose tissue of obese young mice. *Regulatory peptides.* 2012; 174:6-11.
 169. Sozio MS, Liangpunsakul S, Crabb D. The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis. *Semin Liver Dis.* 2010 Nov;30(4):378-90.
 170. Stein EM, Strain G, Sinha N, Ortiz D, Pomp A, Dakin G et al. Vitamin-D insufficiency prior to bariatric surgery: risk factors and a pilot treatment study. *Clin Endocrinol* 2009; 71: 176–183.
 171. Stephens M, Ludgate M, Rees DA. Brown fat and obesity: the next big thing? *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011 Jun;74(6):661-70.
 172. Stice E, Figlewicz DP, Gosnell BA, Levine AS, Pratt WE. The contribution of brain reward circuits to the obesity epidemic. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013; 37: 2047-2058.
 173. Straznický NE, Lambert GW, Masuo K, Dawood T, Eikelis N, Nestel PJ, McGrane MT, Mariani JA, Socratous F, Chopra R, Esler MD, Schlaich MP & Lambert EA (2009). Blunted sympathetic neural response to oral glucose in obese subjects with the insulin-resistant metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 89, 27–36
 174. Sun MK. Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. *Prog Neurobiol.* 1995 Oct;47(3):157-233.
 175. Symonds ME, Sebert SP, Hyatt MA, Budge H. Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nature reviews. Endocrinology.* 2009; 5:604–10.
 176. Tain YL, Hsu CN, Chan JY. PPARs Link Early Life Nutritional Insults to Later Programmed Hypertension and Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2015 Dec 24;17(1). pii: E20.
 177. Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E, Maruyama Y. Effects of ventromedial hypothalamus stimulation on glycogenolysis in rat liver using in vivo microdialysis. *Metabolism.* 1997; 46:897-901.
 178. Tentolouris N, Liatis S, Katsilambros N. Sympathetic system activity in obesity and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1083:129–52. doi:10.1196/annals.1367.010.

179. Tholon L, Neliat G, Chesne C, Saboureau D, Perrier E, Branka JE. An in vitro, ex vivo, and in vivo demonstration of the lipolytic effect of slimming liposomes: An unexpected alpha(2)-adrenergic antagonism. *J Cosmet Sci.* 2002 Jul-Aug;53(4):209-18.
180. Toste FP, de Moura EG, Lisboa PC, Fagundes AT, de Oliveira E, Passos MC. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *The British journal of nutrition.* 2006; 95:830-7.
181. Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochemistry and Biophysics Acta.* 2010; 1801:299-310.
182. Trevenzoli IH, Pinheiro CR, Conceição EP, Oliveira E, Passos MC, Lisboa PC et al., . Programming of rat adrenal medulla by neonatal hyperleptinemia: adrenal morphology, catecholamine secretion, and leptin signaling pathway. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism.* 2010a; 298:E941-92010.
183. Trevenzoli IH, Rodrigues AL, Oliveira E, Thole AA, Carvalho L, Figueiredo MS et al., . Leptin treatment during lactation programs leptin synthesis, intermediate metabolism, and liver microsteatosis in adult rats. *Hormone and metabolic research.* 2010b; 42:483-90.
184. Trevenzoli IH, Valle MMR, Machado FB, Garcia RMG, Passos MCF, Lisboa PC et al., . Neonatal hyperleptinaemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *The Journal of physiology.* 2007; 580:629-37.
185. Tupone D, Madden CJ, Morrison SF. Autonomic regulation of brown adipose tissue thermogenesis in health and disease: potential clinical applications for altering BAT thermogenesis. *Front Neurosci.* 2014 Feb 7;8:14. eCollection 2014.
186. Vaiserman AM. Early-life exposure to substance abuse and risk of type 2 diabetes in adulthood. *Curr Diab Rep.* 2015 Aug;15(8):624. doi: 10.1007/s11892-015-0624-3.
187. Valenzuela OA, Jellyman JK, Allen VL, Holdstock NB, Fowden AL. Effects of maternal dexamethasone treatment on pancreatic β cell function in the pregnant mare and postnatal foal. *Equine Vet J.* 2015
188. Van den Oever MC, Spijker S, Smit AB. The synaptic pathology of drug addiction. *Adv Exp Med Biol.* 2012;970:469-91. doi: 10.1007/978-3-7091-0932-8_21
189. Vanlint S. Vitamin D and obesity. *Nutrients.* 2013 Mar 20;5(3):949-56.
190. Velkoska E, Cole TJ, Morris MJ. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *The American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism.* 2005; 288:E1236-43.
191. Vernochet C, Damilano F, Mourier A, Bezy O, Mori MA, Smyth G, Rosenzweig A, Larsson NG, Kahn CR. Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications. *FASEB J.* 2014 Oct;28(10):4408-19.

192. Videla, L. a, Rodrigo, R., Orellana, M., Fernandez, V., Tapia, G., Quiñones, L., ... Poniachik, J. (2004). Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 106(3), 261–8.
193. Villanueva EC, Myers MG Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *The International Journal of Obesity (London)*. 2008; 32:S8-12.
194. Wamberg L, Christiansen T, Paulsen SK, Fisker S, Rask P, Rejnmark L, Richelsen B, Pedersen SB. Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue - - the effect of obesity and diet-induced weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2013 May;37(5):651-7.
195. Wang SP, Laurin N, Himms-Hagen J, Rudnicki MA, Levy E, Robert MF et al., The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obesity Research*. 2001; 9:119-128.
196. Watanabe M, Yamamoto T, Mori C, Okada N, Yamazaki N, Kajimoto K, Kataoka M, Shinohara Y. Cold-induced changes in gene expression in brown adipose tissue: implications for the activation of thermogenesis. *Biol Pharm Bull*. 2008 May;31(5):775-84.
197. Wei W, Pham K, Gammons JW, Sutherland D, Liu Y, Smith A, Kaczorowski CC3,4, O'Connell KM. Diet composition, not calorie intake, rapidly alters intrinsic excitability of hypothalamic AgRP/NPY neurons in mice. *Sci Rep*. 2015 Nov 23;5:16810.
198. Wong KE, Szeto FL, Zhang W, Ye H, Kong J, Zhang Z, Sun XJ, Li YC. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Apr;296(4):E820-8.
199. Wong, K.E., Szeto, F.L., Zhang, W., Ye, H., Kong, J. et al. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. *AJP Endocrinology and Metabolism*. 2009, 296, E820–E828.
200. World Health Organization. Obesity and overweight. Fact sheet N°311. Updated January 2015
201. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen T, Lu Z & Holick MF Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*. 2000, 72, 690-3.
202. Wright RJ, Brunst KJ. Programming of respiratory health in childhood: influence of outdoor air pollution. *Curr Opin Pediatr*. 2013 Apr;25(2):232-9.
203. Young CN, Morgan DA, Butler SD, Mark AL, Davisson RL. The brain subfornical organ mediates leptin-induced increases in renal sympathetic activity but not its metabolic effects. *Hypertension*. 2013 Mar;61(3):737-44.
204. Young JB, Macdonald IA. Sympathoadrenal activity in human obesity: heterogeneity of findings since 1980. *International journal of obesity and related metabolic disorders*. 1992; 16:959-67.

205. Young JB. Effects of litter size on sympathetic activity in young adult rats. *American journal of physiology*. 2002; 82:R1113-21.
206. Young, J B. “Developmental origins of obesity: a sympathoad-renal perspective,” *International Journal of Obesity*. 2006; 30:S41–S49.
207. Zammit VA 1999 The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function. *Biochemical Journal* 343 505–515.
208. Zemel MB, Miller SL, Moura AS, Carpinelli AR, Barbosa Dietary calcium and dairy modulation of adiposity and obesity risk. *Nutr Rev*. 2004 Apr;62(4):125-31.
209. Zemel MB, Shi H, Greer B, DiRienzo D, Zemel PC: Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J* 4:1132–1138, 2000.
210. Zemel MB. Regulation of adiposity and obesity risk by dietary calcium: mechanisms and implications. *J Am Coll Nutr*. 2002 Apr;21(2):146S-151S
211. Zhang Y, Kerman IA, Laque A, Nguyen P, Faouzi M, Louis GW et al., Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. *The Journal of neuroscience*. 2011; 31:1873-84.