



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Patrícia Novaes Soares

Avaliação da preferência alimentar e dos sistemas dopaminérgico e endocanabinoide no modelo de programação pelo desmame precoce em ratos Wistar de ambos os sexos

Rio de Janeiro

2019

Patrícia Novaes Soares

Avaliação da preferência alimentar e dos sistemas dopaminérgico e endocanabinoide no modelo de programação pelo desmame precoce em ratos Wistar de ambos os sexos

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Patricia Cristina Lisboa

Coorientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Rio de Janeiro

2019

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

S676 Soares, Patrícia Novaes.
Avaliação da preferência alimentar e dos sistemas dopaminérgico e endocanabinoide no modelo de programação pelo desmame precoce em ratos Wistar de ambos os sexos / Patrícia Novaes Soares – 2019.
54f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Patricia Cristina Lisboa
Coorientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Desmame - Teses. 2. Lactação - Teses. 3. Endocanabinoides. 4. Comportamento alimentar - Teses. I. Lisboa, Patricia Cristina. II. Moura, Egberto Gaspar. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 618.63

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Patrícia Novaes Soares

Avaliação da preferência alimentar e dos sistemas dopaminérgico e endocanabinoide no modelo de programação pelo desmame precoce em ratos Wistar de ambos os sexos

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

Aprovada em 28 de agosto de 2019.

Coorientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Patricia Cristina Lisboa (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Gustavo Casimiro Lopes

Instituto de Educação Física e Desportos – UERJ

Prof. Dr. Júlio Beltrame Deleprane

Faculdade de Nutrição - UERJ

Prof.^a Dra. Luana Lopes de Souza

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a. Dra. Camila Ludke Rossetti

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

A Deus, pai misericordioso, que me deu todo o discernimento para chegar até este dia. À minha mãe Angela e meu irmão Rafael, que amo infinitamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois ao meu lado sempre esteve, me erguendo nos momentos mais difíceis.

A minha mãe Angela, mulher guerreira, um exemplo de dedicação, amor e persistência. Sempre ao meu lado, acreditando mais na minha capacidade do que eu mesmo poderia acreditar.

Ao meu irmão Rafael, que é um dos principais motivos de luta a cada dia, pois sempre procurei ser um espelho para ele, me preocupando em passar todo meu conhecimento.

Ao meu namorado Diego, que me acalmou em todos os momentos de tristeza e que me aplaudiu em todos os momentos de glória.

Ao meu pai, por todo o apoio e compreensão durante esse período.

A minha família e amigos, pois mesmo estando ausente em alguns momentos, tiveram compreensão e me incentivaram a seguir.

A Thamara, que desde o início do doutorado estava comigo como colaboradora no biotério. Compartilhamos todos os projetos que trabalhei, com muito respeito e dedicação.

Ao trio ternura (Eu, Thamara e Fabiele), que sempre após um dia louco de trabalho, me levavam a falência (Outback, compras na Afghan e passeios para descontraír).

Ao ciclo de amizades de vida que fiz no LFE/Crossfit: Deysla, Fabiele, Thamara, Camila, Vanessa, Fernanda. Um grupo de pessoas completamente diferentes, com pensamentos e atitudes diferentes, mas que sempre seguram a barra quando necessário. Que depois de vários burpees e thruster, me davam apoio, secavam minhas lágrimas e até riam das minhas piadas.

A Ellen, que mesmo distante, sempre esteve presente, me dando uma palavra de apoio, me tranquilizando nos momentos difíceis - Gostaria que estivesse aqui no Brasil nesta data tão importante em minha vida.

Aos meus orientadores: Prof^ª. Patricia Cristina Lisboa (orientadora) e Egberto Gaspar de Moura (coorientador), pela confiança em mim depositada para ser uma de suas alunas, oferecendo a oportunidade de alcançar meu sonho de seguir a carreira acadêmica.

A Rosiane, pela revisão do meu trabalho, e pela colaboração de artigo.

A todos do LFE, mestrandos (Andressa), doutorandos (Carla, Iala, Fabiele, Thamara, Vanessa) e pós-doutorandos (Bruna, Camila Rosiane), por estarem dispostos à ajudar, pois mesmo com todas as diversidades, conseguimos manter um ambiente muito agradável de convivência e trabalho.

Não são as espécies mais fortes que sobrevivem, nem as mais inteligentes, e sim as mais suscetíveis a mudanças.

Charles Darwin

RESUMO

SOARES, Patrícia Novaes. **Avaliação da preferência alimentar e dos sistemas dopaminérgico e endocanabinoide no modelo de programação pelo desmame precoce em ratos Wistar de ambos os sexos.** 2019. 54f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O desmame precoce (DP) é um fator de risco para obesidade e suas comorbidades ao longo da vida. Aqui, nós investigamos a associação entre o DP e as mudanças de comportamento alimentar, sistemas dopaminérgicos e endocanabinóides em ratos adultos de ambos os sexos. Para isso, ratas lactantes e suas proles (3 machos e 3 fêmeas) foram divididos em 2 grupos: DP, cujas as mães foram envolvidas com um curativo impedindo a sucção do mamilo nos últimos 3 dias de amamentação; controle (C), cujos filhotes ingeriram leite durante toda a lactação. Aos 175 dias de idade, um desafio alimentar foi realizado: filhotes machos e fêmeas dos grupos C e DP puderam escolher entre as dietas ricas em gordura e/ou açúcar. Os machos do grupo DP preferiram a dieta rica em gordura aos 30 min do teste, embora tenham preferido a dieta rica em açúcar após 12 h. As fêmeas não apresentaram diferenças na preferência entre as dietas palatáveis. Os filhotes de ambos os sexos apresentaram hiperfagia. Aos 180 dias de idade, os filhotes foram eutanasiados e os sistemas dopaminérgico e endocanabinoide foram mensurados por Western blot. Os machos do grupo DP apresentaram menor conteúdo do receptor de dopamina tipo 2 (D2r) no nucleus accumbens (NAc) e no estriado dorsal (DS), enquanto as fêmeas do grupo DP tiveram menor conteúdo de tirosina hidroxilase na área tegmentar ventral e no NAc, menor D1r no NAc e menor D2r no córtex pré-frontal. No hipotálamo lateral (LH), os machos do grupo DP apresentaram redução das enzimas ácido graxo amida hidrolase (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL), enquanto as fêmeas do DP apresentaram redução da enzima N-araquidonil-fosfatidiletanolamina fosfolipase-D (NAPE-PLD) e aumento da enzima FAAH. O DP altera alguns parâmetros dos sistemas dopaminérgicos e endocanabinóides na vida adulta, podendo contribuir com o transtorno alimentar da progênie de maneira sexo-dependente.

Palavras-chave: Lactação. Desmame. Programação. Dieta palatável. Via endocanabinoide.

Via dopaminérgica.

ABSTRACT

SOARES, Patrícia Novaes. **Late effects of early weaning on food preference, dopaminergic and endocannabinoid systems in rats of both sexes.** 2019. 54f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Early weaning (EW) is a risk factor for obesity and its comorbidities later in life. Here, we investigated the association between EW and changes in feeding behavior, dopaminergic and endocannabinoid systems in adult rats of both sexes. For this, lactating rats and pups (3 males and 3 females) were divided into 2 groups: EW (EW), dams were wrapped with a bandage interrupting suckling in the last 3 days of breastfeeding; control, dams whose pups ingested milk throughout breastfeeding. At 175 days of age, a food challenge was performed: male and female offspring of C and EW groups could freely self-select between high-fat and high-sugar diets. EW males preferred high-fat diet at 30 min although they ate more high-sugar diet after 12 h. EW females did not show differences in the preference between the palatable diets. At 180 days of age, offspring were killed and proteins of dopaminergic and endocannabinoid systems were measured by Western blotting. EW offspring from both sexes showed hyperphagia. EW males showed lower type 2 dopamine receptor (D2r) in nucleus accumbens (NAc) and dorsal striatum (DS), while EW females had lower tyrosine hydroxylase in ventral tegmental area and NAc, D1r in NAc and D2r in prefrontal cortex. In lateral hypothalamus, EW males presented lower fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase, while the EW females showed lower N-arachidonyl-phosphatidylethanolamine phospholipase-D (NAPE-PLD) and higher FAAH. The EW alters both dopaminergic and endocannabinoid systems parameters at adulthood, contributing to the eating disorder of the progeny in a sex-dependent manner.

Keywords: Lactation. Weaning. Programming. Palatable diet. Endocannabinoid pathway.

Dopaminergic pathway.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Efeitos diretos e indiretos da obesidade na saúde.....	13
Figura 2 –	Biossíntese de dopamina.....	18
Figura 3 –	Vias do sistema dopaminérgico.....	19
Figura 4 –	Estrutura química dos canabinóides.....	21
Figura 5 –	Biossíntese e hidrólise do sistema endocanabinóide.....	22
Figura 6 –	Comportamento alimentar em ratos machos e fêmeas adultos.....	32
Figura 7 –	Sistema dopaminérgico de ratos machos.....	33
Figura 8 –	Sistema dopaminérgico de ratos fêmeas.....	35
Figura 9 –	Sistema endocanabinóide no LH de machos e fêmeas.....	36
Figura 10 –	Sistema endocanabinóide no TAV de machos e fêmeas.....	37
Figura 11 –	Sistema endocanabinóide no fígado de machos e fêmeas.....	38
Tabela 1 -	Principais alterações induzidas pelo desmame precoce nas proles adultas de ambos os sexos.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP	Desmame precoce
IMC	Índice de massa corporal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
NPY	Neuropeptídeo Y
JAK2	Janus Kinase 2
pSTAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 fosforilada
PVN	Núcleo paraventricular
L-DOPA	1-3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa
TH	Tirosina hidroxilase
DDc	Dopa-descarboxilase
VTA	Área tegumental ventral
NAc	Nucleus accumbens
D1r	Receptore dopaminérgico tipo I
D2r	Receptore dopaminérgico tipo II
DAT	Transportador de dopamina
SEC	Sistema Endocanabinóide
THC	Δ 9-tetrahidrocannabinol
Ecs	Endocanabinóides
2-AG	2-aracondonoilglicerol
AEA	Anandamida
PE	Fosfatidiletanolamina
NAPE	N-acilfosfatidiletanolamina
NAPE-PLD	NAPE-fosfolipase D
PI	Fosfatidilinositol
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipase
AA	Ácido araquidônico
FAAH	Ácido graxo amida hidrolase
MAGL	Monoacilglicerol lipase

CB1	Receptore canabinóide tipo I
CB2	Receptore canabinóide tipo II
AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
SNC	Sistema nervoso central
GPR55	Receptor órfão
TRPV1	Receptor de potencial transitório V1
PPAR- α	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma α
PPAR- δ	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma δ
PPAR- γ	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma γ
LH	Hipotálamo lateral
NAc	Núcleo accumbens
MCH	Hormônio concentrador de melanina
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
LPS	Lipopolissacarídeos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	REVISÃO DA LITERATURA	13
1.1	Obesidade	13
1.1.1	<u>Programação Metabólica</u>	14
1.1.2	<u>Lactação e desmame precoce</u>	15
1.2	Mecanismos centrais reguladores da ingestão alimentar	17
1.2.1	<u>Sistema dopaminérgico</u>	17
1.2.2	<u>Sistema endocanabinóide</u>	20
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivo específico	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Modelo experimental	28
4.2	Ingestão de alimentos e massa corporal	28
4.3	Avaliação do comportamento alimentar	29
4.4	Eutanásia e coleta de tecidos	29
4.5	Análise de Western blot	30
4.6	Análise estatística	31
5	RESULTADOS	32
5.1	Comportamento Alimentar	32
5.2	Biomarcadores do sistema dopaminérgico	33
5.3	Biomarcadores da ECS no hipotálamo lateral (LH)	36
5.4	Biomarcadores da ECS no tecido adiposo visceral branco (TAV)	37
5.5	Biomarcadores de ECS no fígado	38
6	DISCUSSÃO	39
	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	44

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos e em animais demonstraram que mudanças ambientais e nutricionais durante a gravidez e a lactação podem iniciar mudanças permanentes no metabolismo que levam a várias doenças ainda na vida (BARKER, 2003; SELLAYAH; CAGAMPANG, 2018; REYNOLDS et al., 2019). Esse fenômeno, conhecido como programação metabólica, envolve alterações epigenéticas em janelas críticas do desenvolvimento e desempenha um papel importante, por exemplo, no aparecimento da obesidade (DE MOURA et al., 2009).

A amamentação é considerada um período crítico, uma vez que o leite é a primeira fonte de nutrição para o bebê após o nascimento. Uma criança é considerada amamentada exclusivamente quando apenas o leite materno é ingerido sem a ingestão de qualquer outro alimento ou bebida durante os primeiros 6 meses de vida (WHO, 2001). Se qualquer alimento é introduzido antes dos 6 meses, é caracterizado pelo desmame precoce (HARDER et al., 2005).

Sabe-se que a obesidade é uma doença multifatorial que pode estar associada ao desenvolvimento de várias outras doenças metabólicas e é considerada uma grande epidemia do século XXI (WILLIAMS et al., 2015). Alterações no sistema endocanabinóide (ECS) têm sido vistas como um dos mecanismos capazes de regular aspectos relacionados à hiperfagia e maior armazenamento de calorias, desempenhando papel crucial na regulação do balanço energético (WILLIAMS et al., 2015; DEMIZIEUX et al., 2016).

As vias dopaminérgicas mesolímbica e mesocortical influenciam o apetite, motivando a busca por alimentos (BASSAREO, DI CHIARA, 1999; DE MACEDO, DE FREITAS, DA SILVA TORRES, 2016). Esse sistema dopaminérgico consiste em neurônios localizados na área tegmentar ventral (VTA), que liberam dopamina ativando os receptores dopaminérgicos (D1 e D2) nas regiões do cérebro, à medida que o núcleo accumbens (NAc) (HOEBEL et al., 1989; PINHEIRO et al., 2015). Por outro lado, no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, a sinalização da dopamina inibe a alimentação (HANLON et al., 2004). Os endocanabinóides modulam direta e indiretamente a função dopaminérgica (BLOOMFIELD et al., 2016).

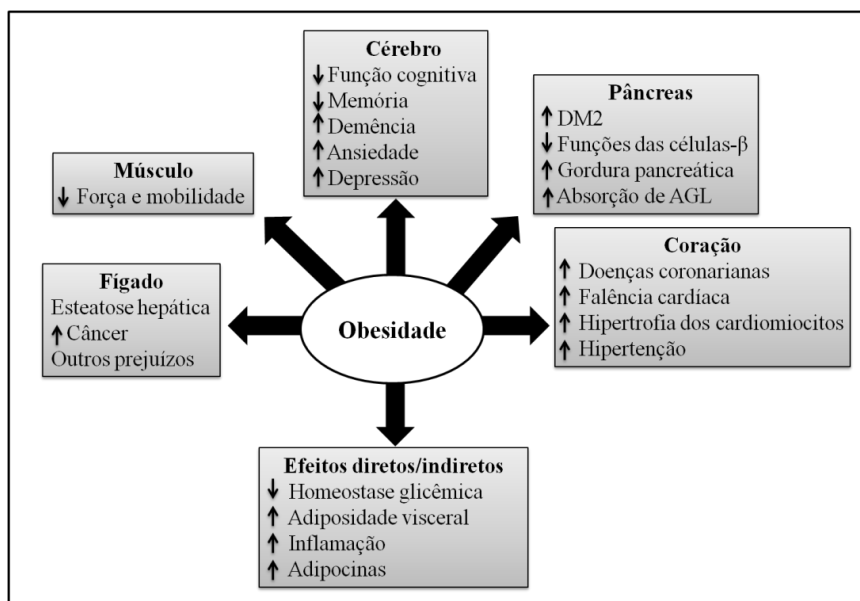
1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Obesidade

Nas últimas décadas, a prevalência da obesidade aumentou mundialmente, atingindo proporções epidêmicas, sendo atualmente considerada como um grande problema de saúde pública (NG et al., 2014; ORNELLAS et al., 2017; VECCHIÉ et al., 2018). É uma doença crônica, multifatorial e pró-inflamatória que se caracteriza por um aumento desproporcional do peso corporal com acúmulo excessivo de tecido adiposo (BASTIEN et al., 2014; GONZALEZ-MUNIESA et al., 2017; SWINBURN, SACKS, RAVUSSIN, 2009).

Diversos estudos têm relacionado alterações genéticas, metabólicas, ambientais e fatores comportamentais ao excesso de peso e/ou a obesidade exercendo efeitos diretos e indiretos na saúde, FIGURA 1, estando associados ao aumento da morbidade e mortalidade. Esse risco é maior quando associado à hipertensão, dislipidemia e resistência à insulina, que caracterizam a síndrome metabólica (WHO, 2000; EMAMI et al., 2016; FAIENZA et al., 2016; KILOV; KILOV, 2018; URANGA, KELLER, 2019; VECCHIÉ et al., 2018).

Figura 1- Efeitos diretos e indiretos da obesidade na saúde



Fonte: Adaptado de URANGA, KELLER (2019)

Segundo Kitahara et al. (2014), um índice de massa corporal (IMC) acima de 40 kg/m² reduz a expectativa de vida em 10 anos. Além disso, os custos para o tratamento da obesidade e suas complicações estão aumentando exponencialmente (KILOV, KILOV, 2018). De fato, o combate à obesidade constitui um objetivo de saúde, já que muitas alterações e patologias estão relacionadas à dieta e ao estilo de vida do indivíduo, sendo necessária a busca de estratégias e tratamentos para o controle da obesidade (PALOU, PICO, BONET, 2003).

Fatores que levam ou protegem da obesidade, como ingestão de alimentos, gasto de energia, armazenamento de lipídios e uso de glicose, estão sob o controle de diferentes sistemas neuro-endócrinos, portanto, para mapear totalmente as vias além das alterações metabólicas, precisamos compreender os mecanismos centrais que controlam a homeostase energética (BUHMANN, LE ROUX, BUETER, 2014; GHANEMI, et al., 2018). Além de todos esses fatores, há aproximadamente 30 anos, alguns estudos vêm demonstrando a importância de insultos em janelas críticas do desenvolvimento sobre a gênese da obesidade, o que será abordado a seguir (BARKER, 1990; BARKER, 2004; DE MOURA et al., 2009; GONZALEZ-MUNIESA et al., 2017; ORNELLAS et al., 2017).

1.1.1 Programação Metabólica

Programação metabólica ou plasticidade ontogenética refere-se a alterações na expressão gênica causadas por insultos nutricionais ou ambientais de caráter transitório durante períodos críticos do desenvolvimento, como gestação e lactação, que podem aumentar o risco do surgimento de doenças na idade adulta (BARKER, 1990; BARKER, 2004; DE MOURA et al., 2009; GONZALEZ-MUNIESA et al., 2017; ORNELLAS et al., 2017).

Alterações epigenéticas estão diretamente associadas a doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e autoimunes, entre outras (OLIVEIRA, JERONIMO, HENRIQUE, 2012). Estas envolvem processos de metilação do DNA, modificações de histonas (acetilação / desacetilação) e RNA de interferência (microRNAs). As alterações epigenéticas podem influenciar a expressão de genes durante os períodos de desenvolvimento intra-uterino e pós-natal, predispondo indivíduos a um fenótipo de sobrepeso ou obesidade que persiste durante a vida adulta, levando a efeitos metabólicos negativos a longo prazo (BLOCK, EL-OSTA, 2017). Segundo Keating, El-Osta (2015), as alterações epigenéticas podem ser conduzidas por uma série de alterações ambientais e de estilo de vida, como alimentação e atividade física, podendo

exercer efeitos no desenvolvimento placentário, neurogênese hipotalâmica e regulação do peso corporal.

Considerando o vasto número de estudos que focam o período da gestação como período de *imprinting* e a escassez de estudos focando a lactação como um importante período de desenvolvimento para os mamíferos, o nosso laboratório vem investigando ao longo de quase 2 décadas o fenômeno de programação para obesidade em roedores causada por insultos impostos exclusivamente durante o período do aleitamento materno e suas consequências em longo prazo. Dentre os modelos animais estudados, destacamos o desmame precoce sem a separação materna, em que os filhotes são impedidos de ter acesso a mama, pelo fato de a rata lactante estar com uma faixa adesiva ao redor do seu corpo no final da amamentação. Este modelo experimental de programação será descrito no próximo tópico.

1.1.2 Lactação e desmame precoce

Segundo a OMS, o aleitamento materno deve ser exclusivo a criança até os 6 meses de vida e após esta fase, inicia-se a introdução de alimentação complementar (WHO, 2001). Assim a desnutrição infantil pode ser resultante da privação do aleitamento materno, impedindo que essa criança receba os nutrientes necessários para seu crescimento e desenvolvimento. A introdução de qualquer alimento antes dos 6 meses de vida é considerado um desmame precoce, relacionando este fator ao desenvolvimento de doenças futuras como obesidade e diabetes (DÖRNER, PLAGEMANN, 1994; Brasil, Ministério Saúde 2005).

Com o crescimento dos índices de mulheres no mercado de trabalho, e com o aumento de crianças “desmamadas precocemente”, o ministério da Saúde criou a lei nº 11.770 de 8 de setembro de 2008, que permite que o tempo da licença maternidade seja de 6 meses (Brasil, ANVISA 2008). Porém pesquisas demonstram que apenas aproximadamente 41% das crianças brasileiras menores de 6 meses são amamentadas exclusivamente (WHO, 2012).

Uma meta-análise com 1500 participantes demonstrou que o desmame precoce está associado ao sobrepeso/obesidade na infância e na idade adulta (HORTA, LORET DE MOLA, VICTORA, 2015). Um dos possíveis mecanismos é de que a amamentação estaria associado a um melhor desenvolvimento da auto-regulação do consumo de energia e a resposta à saciedade (ABARIN et al., 2012; TAVERAS et al., 2004). Toschke et al. (2007), por exemplo, relataram que crianças entre 9-10 anos que foram amamentadas por 6 ou mais meses apresentaram menor

quantidade de tecido adiposo quando comparadas a crianças que foram desmamadas precocemente. Recentemente foi reportado que o aleitamento materno tem consequências a longo prazo na composição corporal, como observado em indivíduos com 30 anos de idade (HORTA et al., 2018).

Com o intuito de confirmar a importância do aleitamento materno, protocolos experimentais são propostos para avaliar as possíveis consequências de um desmame precoce. Kowalski, Ster, Smith (2002) demonstrou que animais privados do leite materno apresentam aumento da expressão de neuropeptídeo Y (NPY, um peptídeo orexigênico) no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo e redução de leptina plasmática, condições estas, que foram revertidas pela administração de leite via gavagem, mas não pela administração de água.

Em nosso laboratório foram desenvolvidos dois modelos animais de desmame precoce: o desmame precoce farmacológico, em que as mães recebem injeção de bromocriptina nos 3 dias finais da lactação, um fármaco pertencente à classe dos agonistas dos receptores da dopamina, que inibe a produção de leite, e o desmame precoce não-farmacológico, no qual as ratas lactantes são enfaixadas no final do 17º dia da lactação, impedindo que a prole beba leite. Ambos os modelos objetivam entender os mecanismos desencadeados pela interrupção do aleitamento materno antes do recomendado, e diferente de outros modelos, evita a separação de mães e filhotes.

No desmame precoce farmacológico, os animais na idade adulta apresentam aumento de massa corporal, maior adiposidade visceral, hiperleptinemia e resistência ao efeito anorexígeno da leptina (BONOMO et al., 2007), hipofunção tireoidiana (BONOMO et al., 2008), dislipidemia, hiperglicemia, resistência insulínica, hipoadiponectinemia, elevação de corticosterona e catecolaminas, hipoprolactinemia e (DE MOURA et al., 2009), aumento da ansiedade e déficit de memória e aprendizado (FRAGA et al., 2011), aumento da expressão de neuropeptídeo Y (NPY), além de inflamação hipotalâmica (YOUNES-RAPOZO et al., 2015). Além disso, esses animais apresentam aumento de massa óssea e de vitamina D circulante (DE ALBUQUERQUE MAIA et al., 2014).

No desmame precoce não farmacológico, os animais adultos apresentam hiperfagia, sobrepeso, aumento da adiposidade visceral, hiperleptinemia, e resistência central à leptina evidenciada pelo menor conteúdo hipotalâmico das proteínas janus Kinase 2 (JAK2) e transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 fosforilada (pSTAT3), aumento de triglicérides sérico, hiperglicemia, resistência à insulina, hipoadiponectinemia, (DA SILVA LIMA et al., 2011). Além disso, evidenciamos que estes animais também apresentam aumento da expressão de NPY e diminuição de transcritos relacionados à anfetamina e cocaína (CART)

especificamente no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN, do inglês *paraventricular nucleus*) (YOUNES-RAPOZO et al., 2012). Adicionalmente, mostrou-se alteração da função da medula adrenal, hipertrofia dos adipócitos e maior expressão de leptina no tecido adiposo visceral (LIMA et al., 2013), além de aumento de massa óssea e vitamina D sérica (DE ALBUQUERQUE MAIA et al., 2014).

Como os resultados mencionados acima foram observados apenas em ratos machos, nosso interesse a partir de então foi avaliar se a programação metabólica promovida pelo desmame precoce não farmacológico poderia ser gênero-específica, principalmente em relação ao fenótipo hiperfágico observado nesse modelo experimental.

1.2 Mecanismos centrais reguladores da ingestão alimentar

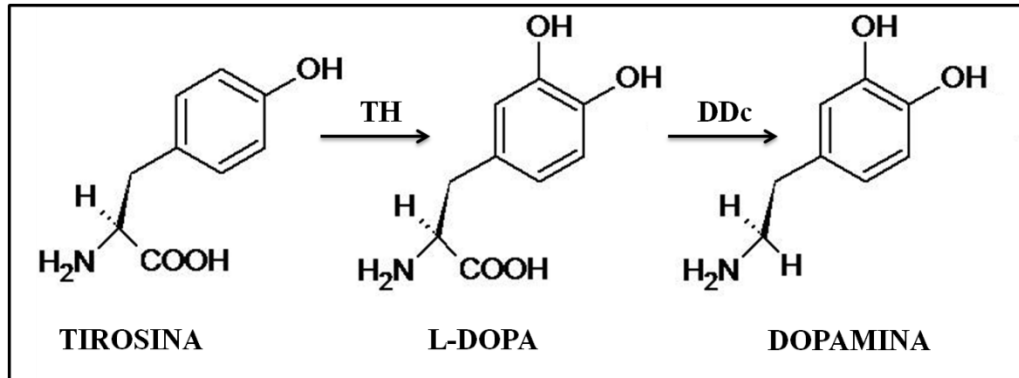
1.2.1 Sistema dopaminérgico

O padrão alimentar na atualidade é caracterizado por uma grande abundância e variedade de alimentos palatáveis, ricos em gordura e açúcar, com sabor apelativo e elevada densidade energética, o que proporciona um quadro mais suscetível à obesidade (RIBEIRO, SANTOS, 2013). O comportamento alimentar é modulado por fatores ambientais e por mecanismos internos distintos: o **mecanismo homeostático**, que está associado a hormônios como leptina, grelina e insulina, que atuam na regulação da fome e/ou saciedade, e o **mecanismo hedônico** que envolve o sistema de recompensa dopaminérgico (BERTHOUD, 2004; BERTHOUD, 2006; EGECIOGLU et al., 2011; LUTTER, NESTLER, 2009; MORTON et al., 2006; SAPER, CHOU, ELMQUIST, 2002).

A dopamina é um neurotransmissor catecolaminérgico envolvido na regulação motivacional da alimentação através da recompensa alimentar. Durante a síntese de dopamina, o aminoácido tirosina é convertido em L-DOPA (1-3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa) por ação da enzima tirosina hidroxilase (TH), a L-DOPA por sua vez sofre a ação da enzima dopa-decarboxilase (DDc) sendo convertida a dopamina, FIGURA 2. A sua ação se dá através da ligação a seus cinco subtipos de receptores, acoplados a proteína G. Os receptores da família D1-like (D1 e D5) são expressos em nível pós-sináptico, enquanto que os receptores D2-like

(D2, D3 e D4) são expressos tanto em nível pós- quanto pré-sinápticos (VALLONE, PICETTI, BORRELLI, 2000).

Figura 2 - Biossíntese de dopamina



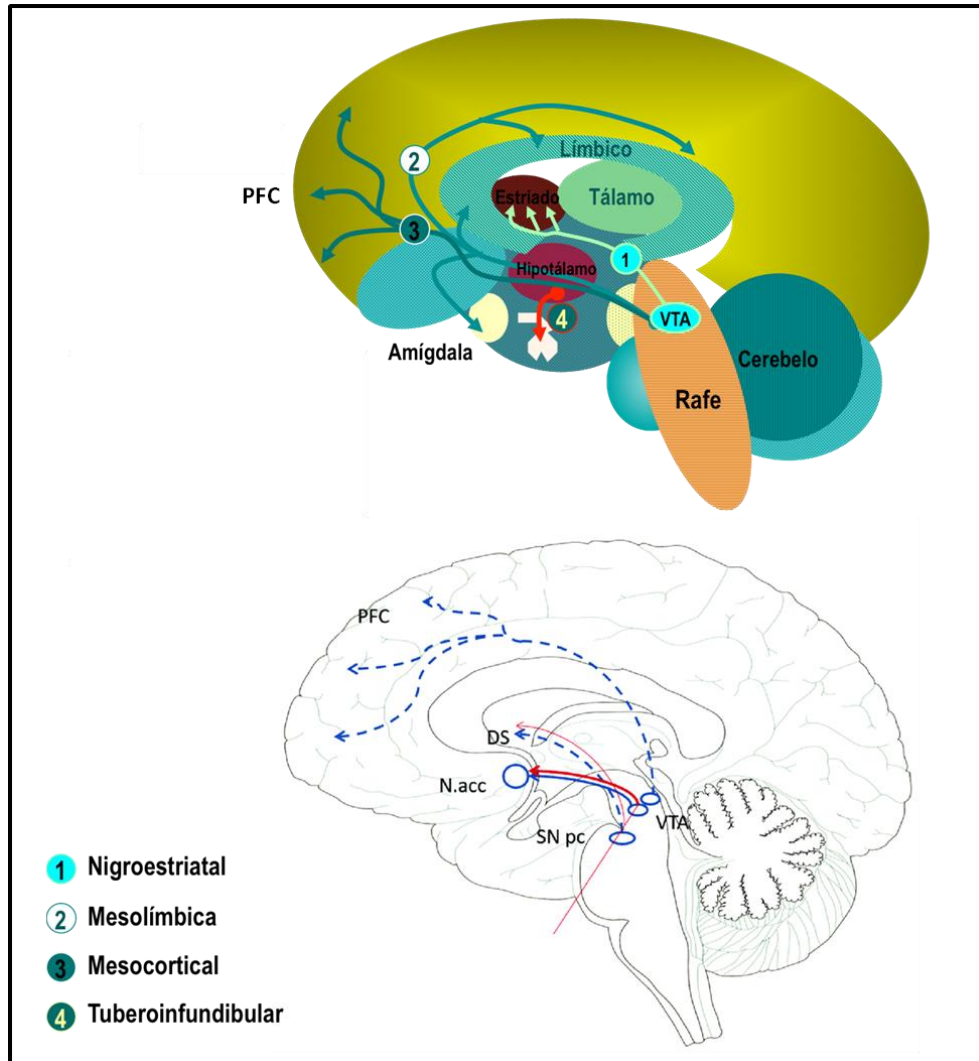
Fonte: Elaborada pela autora.

O sistema dopaminérgico compreende três vias principais: sistema mesocorticolímbico; via nigroestriatal; via tuberoinfundibular. A via dopaminérgica mesolímbica e mesocortical está associada ao sistema de recompensa cerebral, influenciando o apetite e a busca por alimentos (DE MACEDO, DE FREITAS, DA SILVA TORRES, 2016; PINHEIRO et al., 2015). É composto por neurônios localizados na área tegumental ventral (VTA, do inglês *ventral tegumental area*) que projeta axônios dos neurônios dopaminérgicos, liberando dopamina para o nucleus accumbens (NAc) que irá ativar os receptores dopaminérgicos (D1r e D2r) resultando na sensação de prazer (FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2010; HANLON et al., 2004), FIGURA 3.

Estudos demonstraram que a dopamina promove a motivação para a obtenção de recompensa (BERRIDGE, 1996; BERRIDGE, 2009), ou seja, a dopamina pode não desempenhar papel na resposta hedônica, mas sim na motivação para a obtenção da mesma (RIBEIRO, SANTOS, 2013). No entanto, a recompensa também está associada com comportamentos que envolvem emoções como ansiedade, medo, atividade e memória (HAVERMANS, 2011; RIBEIRO, SANTOS, 2013). A utilização de drogas de abuso ou a ingestão de alimentos palatáveis ativam a via de recompensa no cérebro resultando na liberação contínua de dopamina ou na redução na sua recaptção que é realizada pelo transportador de dopamina (DAT), tornando-o propício ao desenvolvimento de vício, gerando uma dependência

no indivíduo (BASSAREO, DI CHIARA, 1999; HAJNAL, SMITH, NORNGREN, 2004; RAKOVSKA et al., 2017).

Figura 3 - Vias do sistema dopaminérgico



Fonte: A autora, 2019.

Em indivíduos obesos, estudos relatam uma menor capacidade de sinalização da dopamina, apresentando redução da disponibilidade de D2r (VOLKOW et al., 2008; WANG et al., 2001), além de menor ativação de dopamina em resposta à ingestão de alimentos palatáveis. Em ratos, a ingestão frequente de alimentos ricos em gordura e açúcar resulta na redução de D2r pós-sináptico e redução da sensibilidade à recompensa (KELLEY et al., 2003; STICE et al., 2010).

Em relação aos estudos sobre programação metabólica e sistema dopaminérgico, existem poucos trabalhos descritos na literatura. Animais adultos programados pela exposição à fumaça de cigarro durante o período de lactação são obesos e hiperfágicos e apresentam maior preferência por uma dieta hiperlipídica, o que foi atribuído ao menor conteúdo de TH no VTA, e redução de TH e D2r no NAc, conseqüentemente uma redução produção de dopamina e dos mecanismos de recompensa (PINHEIRO et al., 2015). Já animais adultos programados pela exposição isolada à nicotina durante a lactação mostraram maior preferência por uma dieta hiperglicídica, o que foi associado a diminuição do conteúdo de D2r e DAT no NAc, sugerindo um menor ação dopaminérgica (PINHEIRO et al., 2015).

Em nosso laboratório, os animais programados pelo desmame precoce apresentam obesidade e hiperfagia ao longo da vida, mesmo em vigência de uma dieta normocalórica, sendo possível que estas proles apresentem comprometimento do sistema dopaminérgico e tornem-se mais susceptível ao vício alimentar.

1.2.2 Sistema Endocanabinóide (SEC)

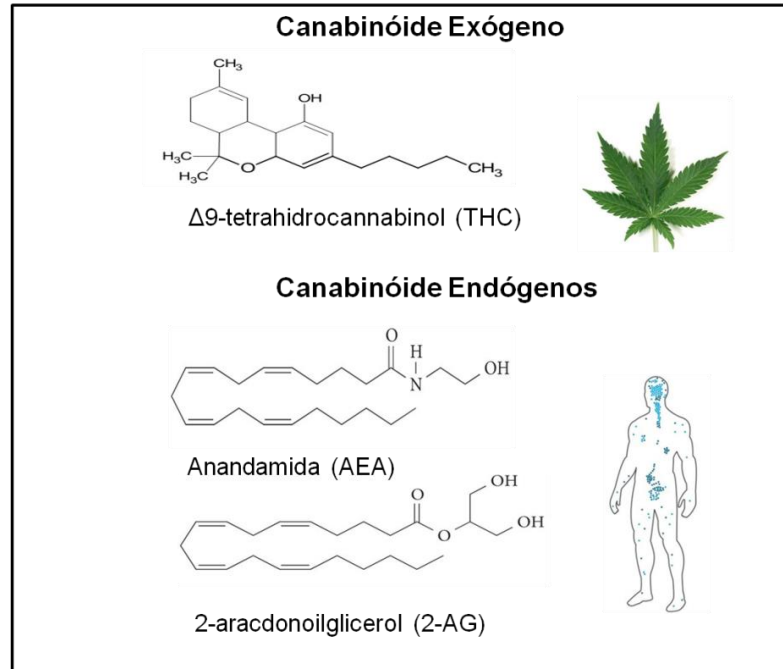
O SEC está associado ao desenvolvimento da obesidade, influenciando diretamente os mecanismos centrais e periféricos envolvidos na regulação da ingestão alimentar e de gasto energético (CARDINAL et al., 2012; WATKINS, KIM, 2015).

Durante anos a *Cannabis Sativa L.* tem sido utilizada como droga ilícita (maconha) (BALSEVICH, PETRIE & HILL, 2017, HANUŠ, 2009), porém apresenta propriedades medicinais, sendo assim indicada para alguns tratamentos medicamentosos (DI MARZO, STELLA, ZIMMER, 2015). O principal componente psicoativo da *Cannabis Sativa L.* é o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) que medeia seus efeitos fisiológicos, agindo sobre os receptores de canabinóides endógenos, ativando processos de síntese, transporte e degradação (ALVHEIM et al., 2014; BALSEVICH, PETRIE, HILL, 2017; PERTWEE, 2015; WATKINS, KIM, 2015).

Os principais canabinóides produzidos pelo organismo (FIGURA 4), chamados endocanabinóides (ECs), são a anandamida (AEA, N-araquidonoil etanolamina) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), lipídios bioativos que tem como principal função atuar na regulação do metabolismo energético e de lipídios (D'ADDARIO et al., 2014; RUBY et al., 2011). Os ECs são derivados de ácido araquidônico e sintetizados sob demanda através de precursores

lipídicos dentro das membranas plasmáticas em resposta a estímulos, como despolarização de membrana e elevações de cálcio intracelular (CASCIIO, MARINI, 2015).

Figura 4 - Estrutura química dos canabinóides



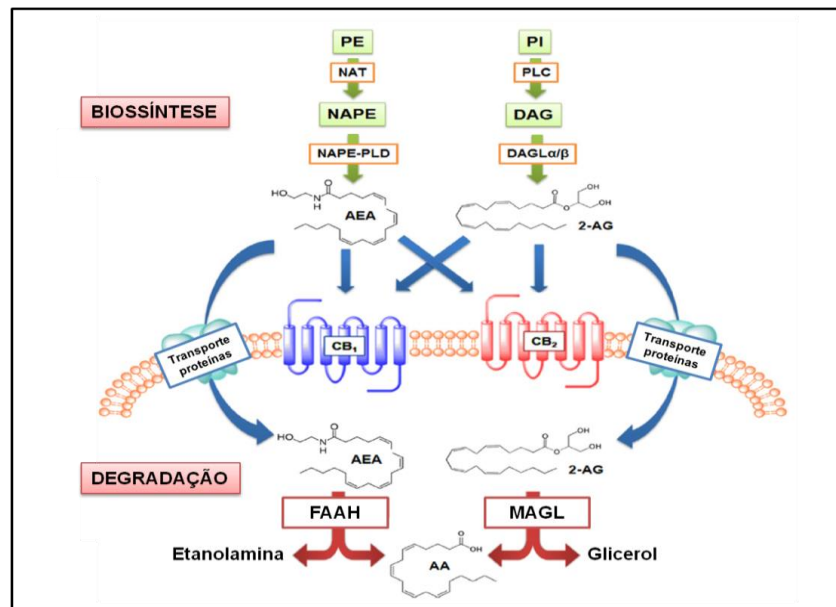
Fonte: Adaptação de LEE et al. (2016).

A biossíntese da AEA inicia com a conversão de fosfatidiletanolamina (PE) em N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) através da enzima N-aciltransferase (NAT), e em seguida ocorre a formação da AEA através da enzima NAPE-fosfolipase D (NAPE-PLD). A biossíntese do 2-AG se inicia com a fosfolipase C (PLC) que hidrolisa o fosfatidilinositol (PI) para a produção de diacilglicerol (DAG). Após a esta etapa, ocorre a conversão em 2-AG através da enzima diacilglicerol lipase (DAGL) α e β . Após a ligação do 2AG e da AEA aos receptores canabinóides, ocorre sua degradação através de enzimas catalíticas. A AEA é degradada em ácido araquidônico (AA) e etanolamina pelo ácido graxo amida hidrolase (FAAH) e o 2-AG é degradado em AA e glicerol pela monoacilglicerol lipase (MAGL) (LEE et al., 2016), como mostrado na FIGURA 5.

Os receptores canabinóides mais conhecidos são os receptores do tipo 1 (CB1) e do tipo 2 (CB2), que possuem sete domínios transmembrana e são acoplados a proteína G. Os ECs ao se ligarem aos seus receptores, inibem a atividade da adenilato ciclase e, como consequência, a produção de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) enquanto estimulam a proteína quinase

ativada por mitógeno (MAPK) (FRANCISCHETTI, ABREU, VIRGINIA, 2006; WATKINS, KIM, 2015). Ambos os receptores tem como função a regulação de fatores fisiológicos centrais e periféricos, incluindo o desenvolvimento neuronal, processos neuromoduladores, metabolismo energético, cardiovascular e respiratório e funções reprodutivas. Além disso, esses receptores também podem modular a proliferação, motilidade, adesão e apoptose celular (BOSIER et al., 2010). O receptor CB1 foi caracterizado em 1990, e se trata de uma proteína transmembrana de 473 aminoácidos que se liga ao THC e aos endocanabinoides (2AG e AEA) (BOSIER et al., 2010; SUÁREZ, SÁNCHEZ, FERNÁNDEZ-CARBALLIDO, 2014). São expressos principalmente no sistema nervoso central (SNC) (DI MARZO, STELLA, ZIMMER, 2015), porém já foi descrito níveis de CB1 em órgãos periférico como tecido adiposo branco (MILLER et al., 2018), fígado (ALSWAT, 2013; DAI et al., 2017; OSEI-HYIAMAN et al., 2005), glândulas suprarrenais (GRAY et al., 2016) e trato gastrointestinal (LEE et al., 2016).

Figura 5 - Biossíntese e hidrólise do sistema endocanabinóide



Fonte: Adaptação de LEE et al. (2016).

O receptor CB2 foi caracterizado em 1993, sendo uma proteína de 360 aminoácidos, com distribuição tecidual limitada e os estudos a seu respeito ainda são muito controversos. Sua principal função é imunossupressora (CABRAL, GRIFFIN-THOMAS, 2009; SUÁREZ, SÁNCHEZ, FERNÁNDEZ-CARBALLIDO, 2014), sendo encontrada tanto a nível tecidual (baço, timo e nódulos linfáticos), como em células do sistema imune (linfócitos, monócitos,

macrófagos e neutrófilos) (BOSIER et al., 2010). Sua expressão é reduzida no SNC, ossos, músculo e coração (WATKINS, KIM, 2015). O CB2 parece desempenhar um papel significativo na neuroinflamação e imunomodulação (ROM, PERSIDSKY, 2013). O uso de seus agonistas parece ter um potencial terapêutico no tratamento de transtornos infecciosos do SNC (ALFERINK et al., 2016). Além disto, seu papel no fígado foi reconhecido mais recentemente, apresentando propriedades antifibrogênicas (DAI et al., 2017) e relação com inflamação hepática (ALSWAT, 2013).

Outros receptores de canabinoides são descritos na literatura, como o receptor órfão (GPR55), receptor de potencial transitório V1 (TRPV1) e os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR) α , δ e γ (SUÁREZ, SÁNCHEZ, FERNÁNDEZ-CARBALLIDO, 2014). O GPR55 está localizado no SNC e em tecidos periféricos como glândulas suprarrenais, baço, fígado, trato gastrointestinal, osso e vasos e estão envolvidos no controle da dor (RYBERG et al., 2007). O TRPV1 está localizado no SNC e também está envolvido no controle da percepção da dor. Pode ser ativado por diferentes estímulos, como temperaturas acima a 43°C, moléculas como a capsaicina e mediadores lipídicos (TOMINAGA, TOMINAGA, 2005). Os PPAR α , δ e γ desempenham papel na regulação do metabolismo lipídico, homeostase da glicose, sensibilidade à insulina e inflamação. Os ligantes destes receptores são moléculas lipídicas entre as quais, alguns ECs (IZZO, ERNST, 2009; VAN MINH et al., 2017).

Os canabinóides exercem controle regulatório em todos os aspectos relacionados à busca por alimento, ingestão, metabolismo e armazenamento de calorias, exercendo papel crucial na regulação do balanço energético (BERMUDEZ-SILVA, CARDINAL, COTA, 2012; MAZIER et al., 2015; SILVESTRI, DI MARZO, 2013).

Já está bem descrito na literatura que os canabinóides podem atuar em várias regiões cerebrais para estimular a ingestão de alimentos (BERMUDEZ-SILVA, CARDINAL, COTA, 2012; MAZIER et al., 2015). Os ECs controlam a neurotransmissão excitadora e inibitória por ação clássica, via receptor CB1, que está expresso em neurônios hipotalâmicos, mesolímbicos e do tronco cerebral, atuando assim na homeostase da ingestão alimentar (CASTILLO et al., 2012; MAZIER et al., 2015; OHNO-SHOSAKU, KANO, 2014). Bellocchio, Lafenetre, Cannich et al. (2010) mostraram funções opostas do CB1 no cérebro na regulação da ingestão alimentar. Primeiro, via transmissão glutamatérgica (excitatória), os ECs via CB1 aumentam a ingestão de alimentos. Segundo a ativação do CB1 no núcleo estriado ventral reduz a via de transmissão GABAérgica (inibitória), inibindo a ingestão de alimentos. Quantidades baixas ou altas de ECs controlam diferencialmente os efeitos dependentes do CB1 (CASTILLO et al.,

2012; MAZIER et al., 2015; OHNO-SHOSAKU, KANO, 2014; SANCHEZ-FUENTES et al., 2016).

Sabe-se que o hipotálamo lateral (LH, do inglês *lateral hypothalamus*) atua na integração de sinais que transmitem informação sobre o estado energético corporal (SANCHEZ-FUENTES et al., 2016). O LH está envolvido no controle da ingestão alimentar, expressando orexina e hormônio concentrador de melanina (MCH) que estão relacionados com a excitação e motivação do comportamento alimentar em áreas corticais, límbicas e basais do cérebro (JO, WIEDL, ROLE, 2005). Os ECs aumentam o apetite através de mudanças na excitabilidade dos neurônios do LH (JO, WIEDL, ROLE, 2005), via receptor CB1 (SANCHEZ-FUENTES et al., 2016).

No núcleo accumbens (NAc), o SEC tem o papel ampliar o prazer por alimentos palatáveis (MAHLER, SMITH, BERRIDGE, 2007), sugerindo que o impacto da recompensa alimentar pode ser parte do mecanismo de promoção e/ou motivação ao apetite. No jejum, ocorre superexpressão de ECs no NAc, gerando o gosto e motivação por alimentos palatáveis, induzido a liberação de dopamina dependente da ativação de CB1 nos terminais glutamatérgicos (MAHLER, SMITH, BERRIDGE, 2007; MALDONADO, VALVERDE, BERRENDERO, 2006).

Os ECs exercem efeitos periféricos dependentes do receptor CB1, atuando sobre o metabolismo lipídico em adipócitos, tecido hepático e muscular (HUANG et al., 2011). A ativação do CB1 no tecido adiposo, fígado, músculo e pâncreas endócrino contribui para o aumento da adiposidade visceral e seus distúrbios metabólicos (COTA et al., 2003; ECKARDT et al., 2009; NAKATA, YADA, 2008; TAM et al., 2012), enquanto o uso de antagonistas do CB1 pode melhorar o fenótipo de obesidade (TAM et al., 2012).

No tecido adiposo branco (TAB), o SEC estimula a lipogênese e a adipogênese (MACCARRONE et al., 2014). De acordo com Cristino, Becker, Di Marzo (2014), todos os componentes do SEC estão presentes no TAB e tecido adiposo marrom (TAM).

Estudos sugerem que o SEC está também envolvido nos processos fisiopatológicos do desenvolvimento de doenças hepáticas agudas e crônicas (DAI et al., 2017; HUANG et al., 2011; PARFIENIUK, FLISIAK, 2008), como doença hepática gordurosa não alcoólica e cirrose (ALSWAT, 2013). De fato, os ECs estão alterados em doenças hepáticas tanto em humanos (BISWAS et al., 2003, CARACENI et al., 2010) como em roedores (OSEI-HYIAMAN et al., 2005; SIEGMUND, SCHWABE, 2008).

Em um fígado saudável, a expressão de CB1 e CB2 está reduzida, porém em doenças hepáticas, ambos os receptores são ativados em células estreladas, células endoteliais vasculares hepáticas e em monócitos (ALSWAT, 2013; PARFIENIUK, FLISIAK, 2008).

Em pacientes com hepatite B crônica, o receptor CB1 tem efeito pro-fibrogênico, enquanto o receptor CB2 tem papel anti-fibrogênico, mostrando a importância do SEC sobre a progressão da fibrose tecidual (DAI et al., 2017). De acordo com Deveaux, Cadoudal, Ichigotani et al. (2009), o uso de um agonista do receptor CB2 em ratos alimentados com dieta rica em gordura por 6 semanas aumentou os triglicerídeos no fígado, causou resistência à insulina e inflamação, mostrando sua participação na gênese de esteatose hepática.

Em animais, a estimulação do receptor CB1 no hepatócito aumentou a expressão de SREBP-1 e das enzimas acetil coenzima-A carboxilase-1 e ácido graxo sintase (FAS), aumentando a síntese de ácidos graxos de novo (HORTON et al., 1998). Além disso, foi observado que uma dieta rica em gordura aumenta os níveis hepáticos de AEA, CB1 e síntese de ácidos graxos, sendo que o bloqueio do receptor CB1 reduz a síntese de ácidos graxos (OSEI-HYIAMAN et al., 2005).

O SEC também parece interferir na homeostasia redox em diversos tecidos (LIPINA & HUNDAL, 2016). Enquanto no fígado, a ativação do CB2 está relacionada ao aumento de estresse oxidativo (CAO et al., 2013), em células BV-2 (microglia), o uso de agonista CB2 inibe a geração de espécies reativas de oxigênio em resposta a lipopolissacarídeos (LPS) (RIBEIRO, SANTOS, 2013).

Em relação aos estudos sobre programação metabólica e SEC, existem poucos trabalhos descritos na literatura. ALMEIDA, DIAS-ROCHA, SOUZA et al. (2017) demonstrou que obesidade materna levou os filhotes machos, no nascimento, a apresentarem aumento de CB1 no hipotálamo associado um aumento de orexina-A e hipoleptinemia, enquanto nos filhotes do sexo feminino houve aumento de receptor CB2 no hipotálamo. Quando adultos, os machos apresentaram redução de CB1 e CB2 no tecido adiposo subcutâneo (machos adultos). No entanto, a prole de fêmeas apresentou redução de CB1 no tecido adiposo subcutâneo e aumento deste receptor no tecido adiposo visceral.

Quanto aos animais adultos programados pelo desmame precoce (obesos e hiperfágicos), acreditamos que estes apresentem alguma disfunção do SEC que ajude a compreender a sua hiperfagia.

2. JUSTIFICATIVA

A obesidade já é uma grande epidemia do mundo moderno caracterizada como uma doença multifatorial, com aumento de peso corporal e excesso de tecido adiposo abdominal acompanhado de inflamação e estresse oxidativo. Essa doença está associada ao desenvolvimento de dislipidemia, diabetes *mellitus* tipo 2 e doenças cardiovasculares. Além dos maus hábitos alimentares e do sedentarismo, atualmente sabe-se que a obesidade e a síndrome metabólica também podem ser oriundas de insultos provocados no início da vida.

A interrupção do aleitamento materno exclusivo em uma criança antes dos 6 meses de idade é considerado desmame precoce. Na literatura, estudos epidemiológicos e experimentais descrevem a relação entre o desmame precoce com o desenvolvimento de obesidade e hiperfagia. Assim, o desmame precoce é um modelo interessante para estudar o fenômeno de programação metabólica.

A dopamina é o neurotransmissor que está relacionado com o sistema de recompensa no cérebro. A utilização de drogas ilícitas ou a ingestão de alimentos ricos em gordura e açúcar ativam o sistema dopaminérgico de recompensa e a via do prazer no cérebro resultando na liberação contínua de dopamina ou na redução na sua recaptção. Em contrapartida, os canabinóides endógenos estimulam a ingestão alimentar e inibem metabolismo energético, e na literatura há relatos de que a hiperfunção do sistema endocanabinóide participa ativamente da gênese da obesidade. Vale ressaltar que a relação entre sistema dopaminérgico, SEC, hiperfagia e programação metabólica no contexto de obesidade ainda é pouco explorada.

Portanto, considerando a hiperfagia e outras disfunções associadas à obesidade previamente detectadas no modelo experimental de desmame precoce não farmacológico, nossa hipótese é de que os animais desmamados precocemente poderiam apresentar maior preferência por dietas palatáveis com disfunções dos sistemas dopaminérgico e/ou endocanabinóide na vida adulta. Além disso, essas alterações podem ocorrer de maneira tecido- e sexo-dependente.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o sistema dopaminérgico e endocanabinóide em ratos adultos, de ambos os sexos, programados pelo desmame precoce.

3.2 Objetivo Específico

Investigar na prole aos 180 dias de idade, de ambos os sexos, que foram programados pelo desmame precoce, os seguintes parâmetros:

- Comportamento alimentar:

a) Teste de preferéncia alimentar.

- Expressão de proteínas da via de sinalização do sistema dopaminérgico:

a) TH no VTA;

b) TH, DAT, D1r e D2r no NAc, PFC e DS;

c) D2r no ARC.

- Expressão de proteínas da via de sinalização do sistema endocanabinóide:

a) NAPE-PLD, FAAH, DAGL, MAGL, CB1 e CB2 no LH, fígado e tecido adiposo branco visceral.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo experimental

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA / 035/2017). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e refinar os procedimentos. Os animais foram mantidos em uma sala sob temperatura controlada (21 ± 2 °C), umidade ($55\% \pm 5\%$) e ciclo claro-escuro (12/2 h) com acesso gratuito à água e ração comercial padrão para roedores (Nuvilab® São Paulo, SP, Brasil). Aos 90 dias de idade, ratos Wistar nulíparas foram acasalados com machos (2 fêmeas / 1 macho) por 7 dias. Após o acasalamento, cada fêmea foi colocada em uma gaiola individual, com livre acesso a água e alimentos até o parto. Após o nascimento, as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes (3 machos e 3 fêmeas) por barragem de ratos em lactação e divididos aleatoriamente em 2 grupos: o grupo controle (C, n = 7), ou seja, barragens cujos filhotes tiveram um período de lactação padrão (21 dias) e o grupo de desmame precoce (PE, n = 7), ou seja, barragens levemente anestesiadas e envolvidas com um curativo para impedir que os filhotes acessem as tetas nos últimos 3 dias de lactação. Os métodos referentes ao modelo de desmame precoce são descritos em detalhes em nosso estudo anterior (LIMA et al., 2011). Os animais receberam livremente dieta padrão para roedores (Nuvilab®, São Paulo, Brasil) e água potável.

4.2 Ingestão de alimentos e massa corporal

Durante a lactação, a massa corporal dos filhotes era monitorada diariamente. Após o desmame, ou seja, dia 21 pós-natal (PN21), a massa corporal e a ingestão de alimentos foram avaliadas a cada 3 dias até PN180. A quantidade de ingestão de alimentos foi estimada a partir da diferença entre o peso dos alimentos deixados na gaiola e a quantidade total colocada na gaiola três dias antes.

4.3 Avaliação do comportamento alimentar

No PN175, os animais foram submetidos ao teste de desafio alimentar durante a noite (AVENA, RADA, HOEBEL, 2009), que é o período ativo para roedores. Primeiro, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas, das 9h às 21h, após o qual foram selecionados entre uma dieta rica em gordura (mais 20% de teor de gordura saturada em comparação com a ração padrão) e uma dieta rica em açúcar (mais 38% de sacarose em comparação com a ração padrão). O primeiro registro de ingestão de alimentos ocorreu às 21h30; assim, a voracidade foi determinada calculando a quantidade de comida consumida durante o período inicial de 30 minutos. No dia seguinte (9h), a ingestão de alimentos foi registrada calculando a quantidade de comida consumida durante o período de 12 horas anterior. As dietas foram preparadas de acordo com a recomendação do Instituto Americano de Nutrição (AIN 93M) para dietas para roedores (REEVES, NIELSEN, FAHEY, 1993).

4.4 Eutanásia e coleta de tecidos

A eutanásia dos animais foi realizada em PN180. Antes da eutanásia, os animais foram submetidos a jejum durante a noite e os pesos corporais dos animais foram medidos. Uma dose letal de tiopental foi injetada e o sangue foi obtido por punção cardíaca. O sangue foi coletado no tubo de heparina e centrifugado (2500 rpm, 25 min, 4 ° C). O plasma foi armazenado a -20 ° C. Fígado, tecido adiposo visceral (IVA) e cérebro (para extração do hipotálamo) foram coletados e armazenados a -80 ° C para procedimentos adicionais. Todo o cérebro foi cuidadosamente coletado e armazenado a -80 ° C. Cortes do cérebro coronal foram cortados usando um criostato (HyraX C25, Zeiss, Alemanha) e socos do hipotálamo lateral (LH, -2,10 a -3,6 mm), estriado dorsal (DS, Bregma 2,16 a 0,96 mm), núcleo accumbens (NAc, Bregma 2,16 a 0,96 mm), núcleo arqueado do hipotálamo (ARC, Bregma -2,1 a -3,6 mm), córtex pré-frontal (PFC, bregma 4,20-2,52 mm) e área tegmental ventral (VTA, Bregma -5,64 a -6,36 mm) foram extraído do cérebro (LIMA et al., 2011).

4.5 Análise de Western blot

No LH, VAT e fígado, medimos os seguintes biomarcadores da ECS: NAPE-PLD, FAAH, DAGL, MAGL, CB1r e CB2r. Os biomarcadores do sistema dopaminérgico foram avaliados nas seguintes áreas: VTA (TH); PFC, DS e NAc (TH, DAT, D1r e D2r) e ARC (D2r). OTAV, foi homogeneizado em um tampão de extração (extração de proteína de tecido T-PER). O fígado foi homogeneizado em tampão RIPA gelado [Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NP-40 a 1%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM e coquetel de inibidor de protease (F. Hoffmann-La Roche Ltda., Basileia, CH). As amostras foram então centrifugadas a 11000 rpm por 30 min (TAV) ou 13500 rpm por 25 min (fígado). Todos os núcleos cerebrais foram sonicados duas vezes em um processador ultrassônico por 10 s (intervalo de 15 s, amplitude de 40%) com tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NP-40 a 1%, NP-40, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM) com inibidor de protease (F. Hoffmann-La Roche Ltda. Basel, CH). As concentrações de proteína de todos os tecidos foram determinadas usando o Kit de Ensaio de Proteína Pierce BCA (Thermo Scientific, CA, EUA). Os homogenatos foram analisados por SDS-PAGE usando 10 a 30 µg de proteína total. As proteínas foram então transferidas do gel para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (Hybond ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Londres, Reino Unido) e incubadas com solução salina tamponada com Tris (TBS) contendo albumina a 5% por 45 min. Após essa etapa, as membranas foram lavadas com solução salina tamponada com Tween-tris (0,1%) e incubadas durante a noite a 4 ° C com um anticorpo primário específico: NAPE-PLD (1: 200 - cod: ab95397, Abcam), FAAH (1: 500 - cod: ab54615, Abcam), DAGL (1: 500 - cod: ab81984, Abcam), MAGL (1: 100 - cod: sc398942, Santa Cruz Biotechnology), CB1r (1: 100 - cod: ab23703 Abcam), CB2r (1: 500 - cod: ab3561, Abcam), TH (1: 1.000 - cod: T2928 Sigma), DAT (1: 500 - cod: ab1591P Millipore), D1r (1: 500 - cod: ab81296 Abcam), D2r (1: 500 - cod: ab5084P Millipore), GAPDH (1: 1.000 - cod: D16H11, sinalização celular) e β-actina (1: 1.000-cod: A2228, Sigma-Aldrich). As membranas foram então lavadas três vezes com Tween TBS (0,1%) e incubadas por 1 h com um anticorpo secundário apropriado conjugado com biotina (1: 7.000, 1: 10.000 e 1: 20.000, anti-coelho, anti-cabra ou anti-camundongo de Sigma-Aldrich, Invitrogen Corporation, CA, EUA) à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas novamente três vezes com Tween-TBS (0,1%) e incubadas com peroxidase de rábano conjugado com estreptavidina (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As bandas de proteínas foram visualizadas por um kit de

quimioluminescência (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad Laboratories Inc., EUA), seguido de exposição ao Image Quant LAS (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). A área e a densidade das bandas foram quantificadas usando o software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde Wayne Rasband, MA, EUA) e normalizadas para β -actina. Os resultados foram expressos como porcentagens (%) do grupo controle (DP).

4.6 Análise estatística

Os dados são mostrados como a média \pm SEM. Apenas um filhote por sexo e por ninhada foi utilizado aleatoriamente para análise. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste *t* de Student não pareado, considerando separadamente o efeito da programação na prole de ratos machos e fêmeas, bem como no estudo de alimentação, onde as dietas foram avaliadas separadamente. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significantes em $p < 0,05$.

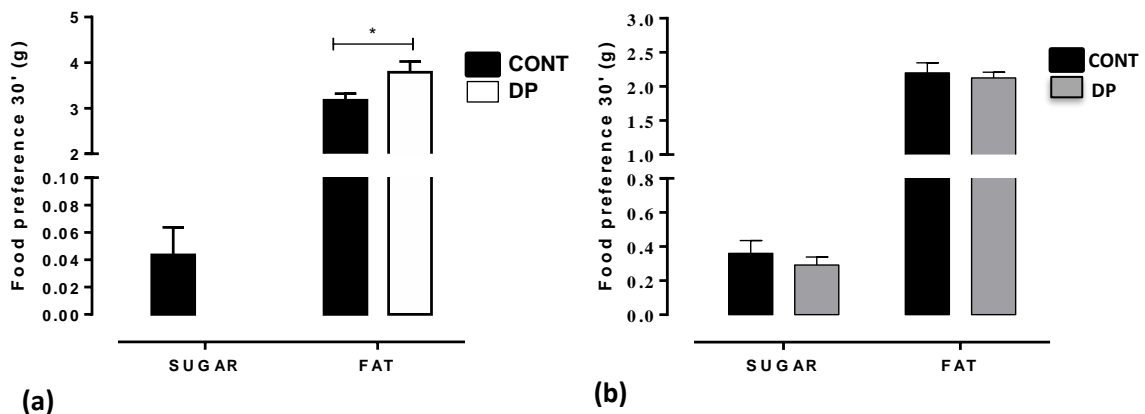
5. RESULTADOS

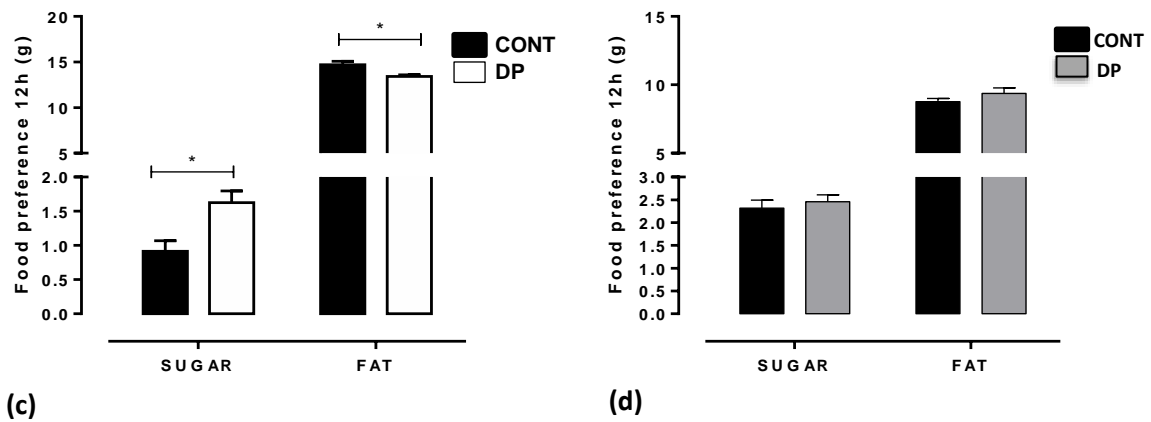
Os machos do grupo DP apresentaram maior ingestão alimentar (+ 15% - $p < 0,05$), além de maior adiposidade visceral (+ 54% - $p < 0,05$), conforme apresentado na Tabela 2. Esses dados estão de acordo com os achados de um estudo anterior (FRANCO et al., 2013). Neste estudo, demonstramos que esses parâmetros também apresentaram as mesmas alterações nas fêmeas de PE: consumo de alimentos (+ 5% - $p < 0,05$) e massa de gordura visceral (+ 51% - $p < 0,05$).

5.1 Comportamento Alimentar

Após 30 minutos das dietas palatáveis oferecidas, os machos DP não consumiram uma dieta rica em açúcar (Figura 6A); por outro lado, consumiram dieta mais rica em gordura que o grupo CONT (+ 19%; Figura 6A - $p < 0,05$). Após 12 h, observamos um aumento no consumo de dieta com alto teor de açúcar nos machos DP (+ 78%, Figura 6B - $p < 0,05$). Em relação à dieta hiperlipídica, os homens do DP apresentaram menor consumo de gordura (-9%; Figura 6B - $p < 0,05$) em relação ao grupo CONT. As fêmeas do EW não mostraram diferença na preferência por dietas com açúcar ou gordura em relação ao grupo CONT durante o teste de desafio alimentar (Figura 6C e 6D).

Figura 6 – Comportamento alimentar em ratos machos e fêmeas adultos



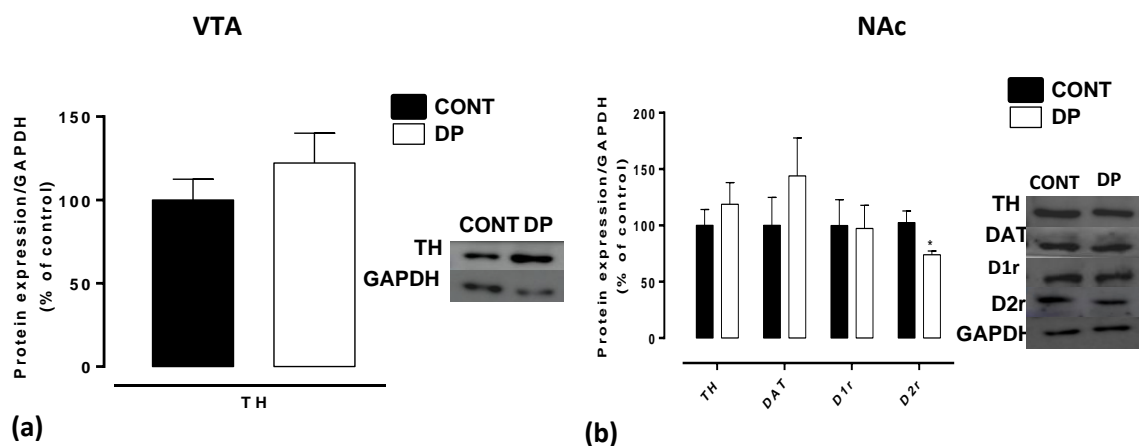


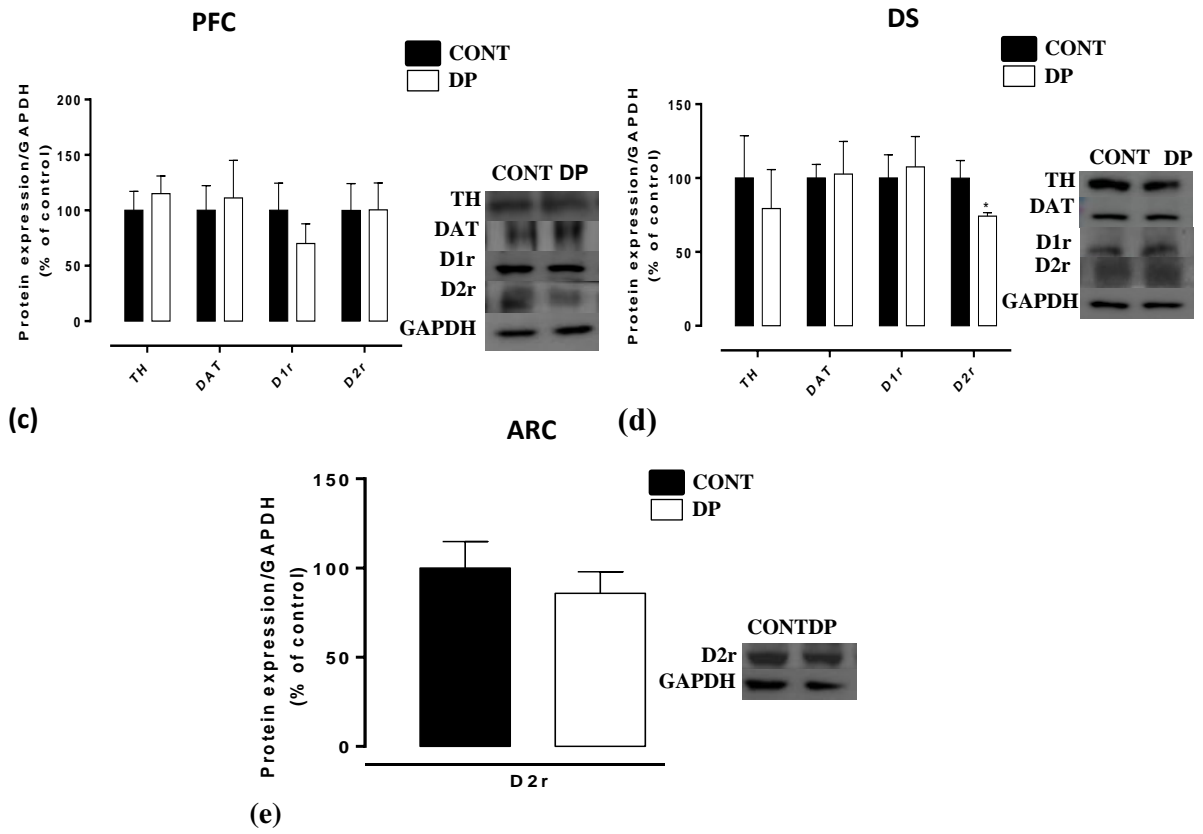
Legenda: CONT – grupo controle; DP – grupo desmame precoce.
Fonte: A autora, 2019.

5.2 Biomarcadores do sistema dopaminérgico

Não observamos diferença significativa nos parâmetros do sistema dopaminérgico na VTA (Figura 7A), PFC (Figura 7C) e ARC (Figura 7B) nos machos DP. Encontramos uma diminuição no D2r em NAc (-29%, Figura 7B - $p < 0,05$) e DS (-25%, Figura 7A - $p < 0,05$) em homens com EW. Em relação ao sexo feminino, o grupo PE apresentou menor TH em VTA (-47%, Figura 8A - $p < 0,05$) e NAc (-43%, Figura 8B - $p < 0,05$), além de menor D1r em NAc (-66% , Figura 8B - $p < 0,05$) e menor D2r em PFC (-39%, Figura 8C - $p < 0,05$). As fêmeas DP não apresentaram alterações nos parâmetros dopaminérgicos DS (Figura 8A) e ARC (Figura 8B).

Figura 7 - Sistema dopaminérgico de ratos machos

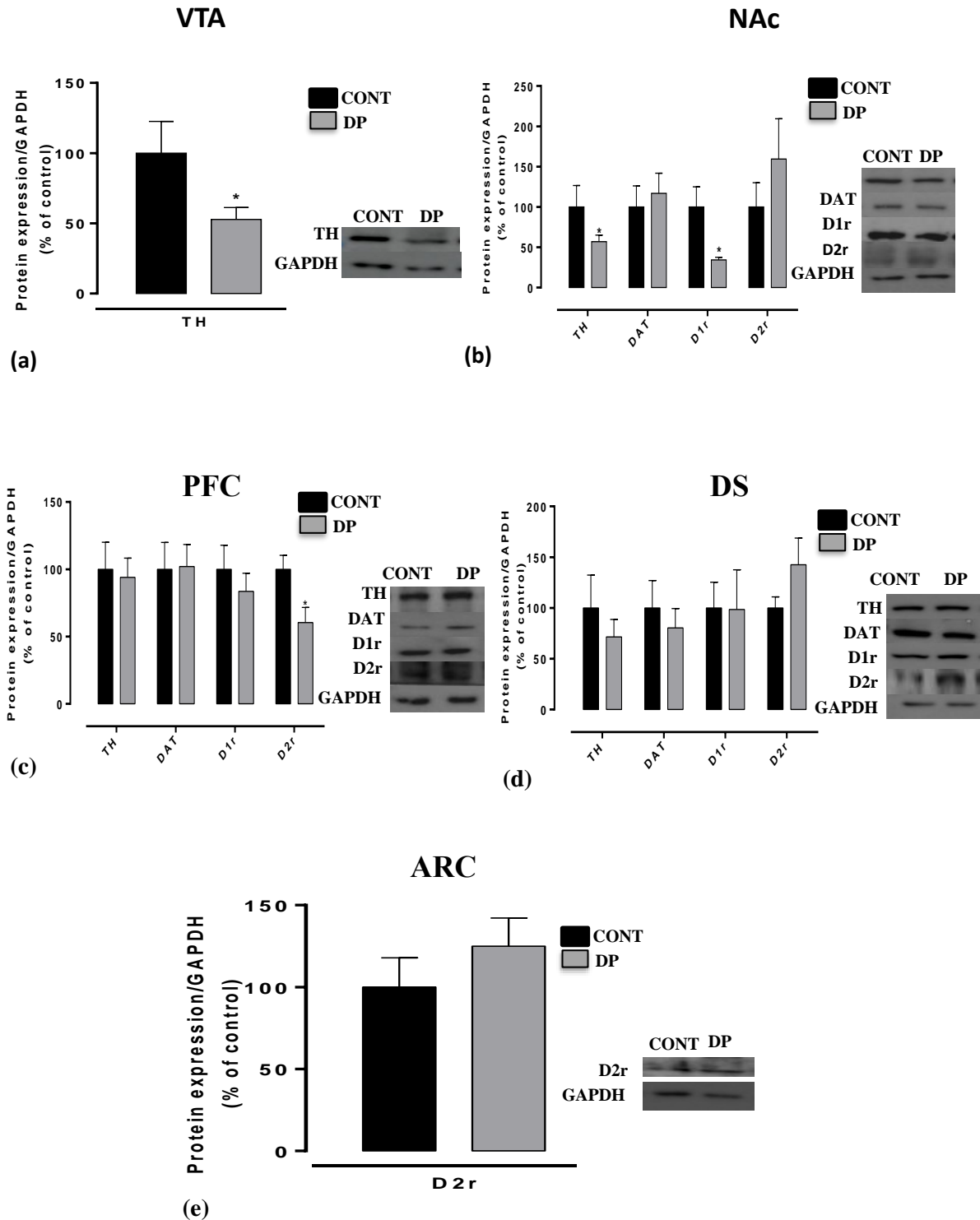




Legenda: CONT – grupo controle; DP – grupo desmame precoce; TH – Tirosina hidroxilase; DAT – transportador de dopamina; D1r – receptor de dopamina tipo I; D2r – receptor de dopamina tipo II, ARC – núcleo arqueado; PFC – córtex pré-frontal, DS – striatum dorsal; VTA – área tegumentar ventral; NAc- núcleo achumbes.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 8 - Sistema dopaminérgico de ratos fêmeas



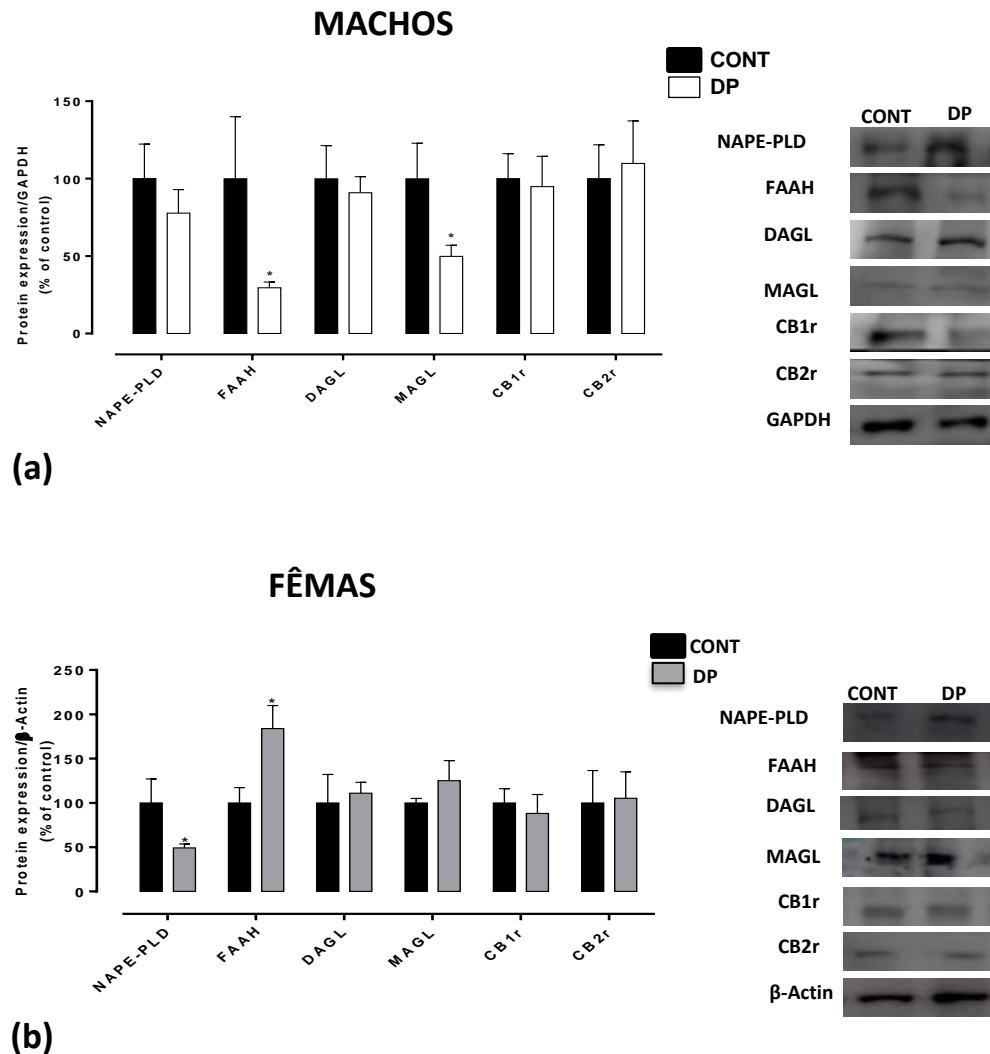
Legenda: CONT – grupo controle; DP – grupo desmame precoce; TH – Tirosina hidroxilase; DAT – transportador de dopamina; D1r – receptor de dopamina tipo I; D2r – receptor de dopamina tipo II, ARC – núcleo arqueado; PFC – córtex pré-frontal, DS – striatum dorsal; VTA – área tegumentar ventral; NAc- núcleo achumbes.

Fonte: A autora, 2019.

5.3 Biomarcadores da ECS no hipotálamo lateral (LH)

No LH dos machos (Figura 9A), o teor de proteínas FAAH e MAGL foi menor no grupo PE (-68%, -50%, respectivamente; $p < 0,05$). Em relação às fêmeas de DP (Figura 9B), observamos diminuição do teor de NAPE-PLD (+ 55% - $p < 0,05$) e aumento do teor de FAAH (+ 84% - $p < 0,05$) no LH. Não detectamos nenhuma alteração no DAGL, CB1r ou CB2r nas fêmeas EW.

Figura 9 - Sistema endocanabinóide no LH de machos e fêmeas



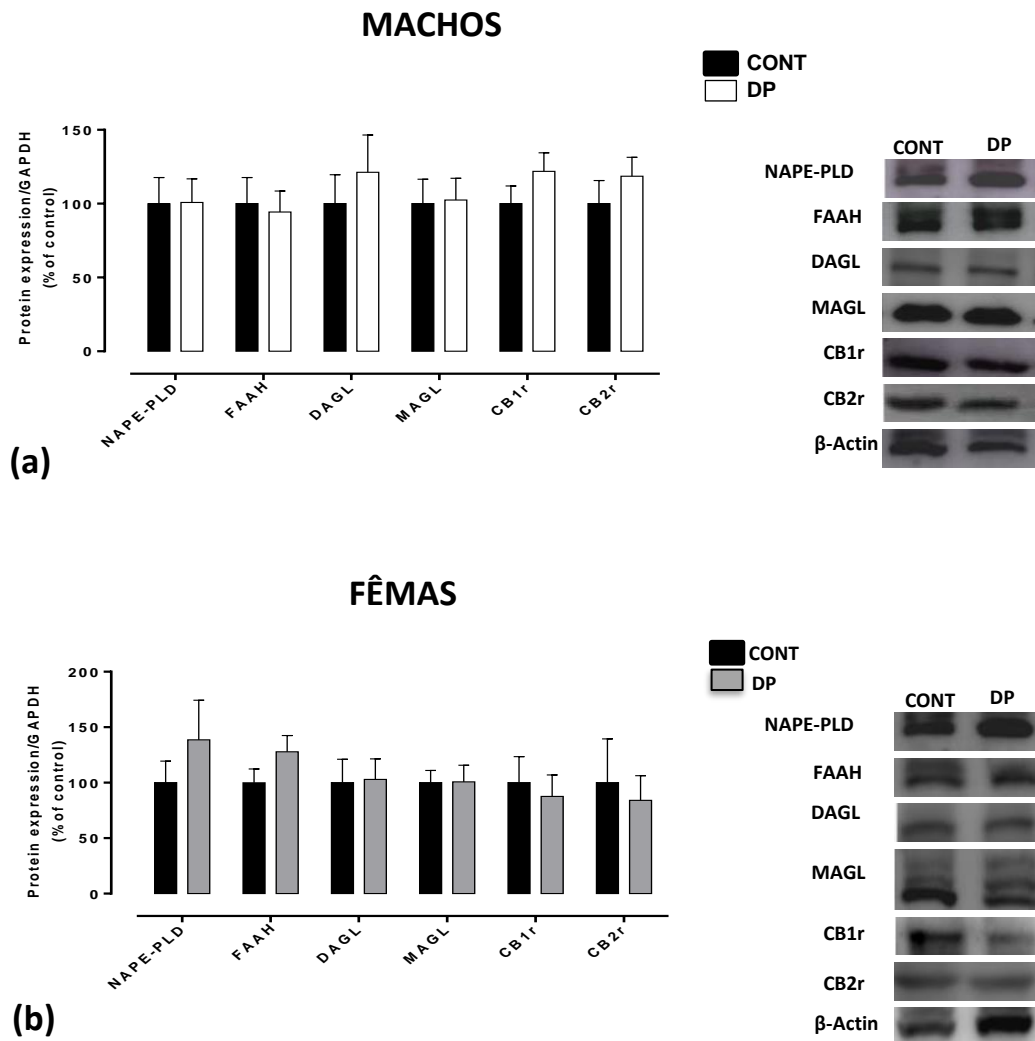
Legenda: CONT – grupo controle; DP– grupo desmame precoce; NAPE-PLD - NAPE-fosfolipase D; FAAH - ácido graxo amida hidrolase; DAGL- diacilglicerol lipase; CB1r - receptores do tipo 1; CB2r – receptor tipo 2.

Fonte: A autora, 2019.

5.4 Biomarcadores da ECS no tecido adiposo visceral branco (TAV)

No TAV, os descendentes de DP de ambos os sexos não apresentaram diferença significativa no conteúdo de proteínas de NAPE-PLD, FAAH, DAGL, MAGL, CB1r e CB2r (machos: Figuras 10A e fêmeas: Figura 10B).

Figura 10 - Sistema endocanabinóide no TAV de machos e fêmeas



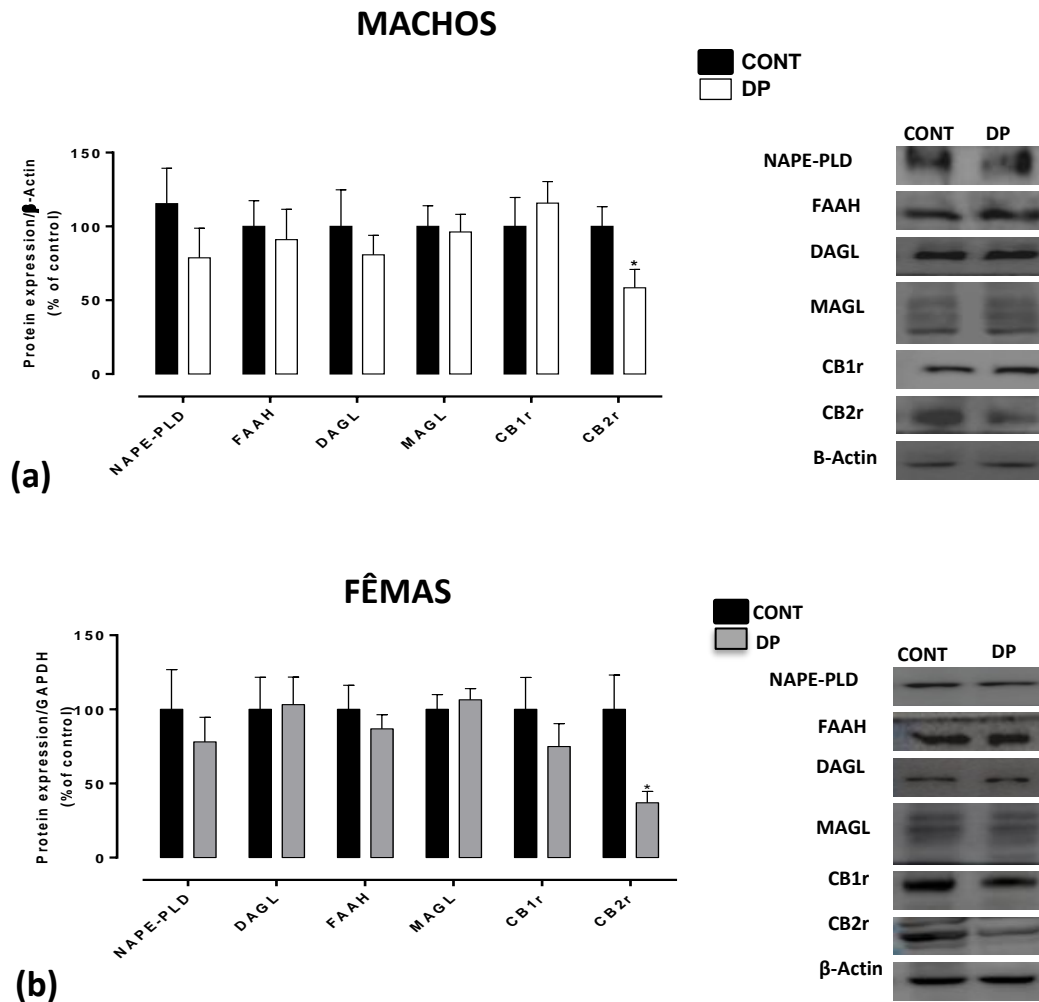
Legenda: CONT – grupo controle; DP– grupo desmame precoce; NAPE-PLD - NAPE-fosfolipase D; FAAH - ácido graxo amida hidrolase; DAGL- diacilglicerol lipase; CB1r - receptores do tipo 1; CB2r – receptor tipo 2.

Fonte: A autora, 2019.

5.5 Biomarcadores de ECS no fígado

No fígado, os descendentes de DP de ambos os sexos apresentaram uma diminuição no CB2r (machos: -42%, Figura 6C e fêmeas: -63%, Figura 7C - $p < 0,05$). Os outros parâmetros do sistema CE não mostraram diferença significativa entre os grupos (machos: Figura 6C e fêmeas: Figura 7C).

Figura 11 - Sistema endocanabinóide no fígado de machos e fêmeas



Legenda: CONT – grupo controle; DP– grupo desmame precoce; NAPE-PLD - NAPE-fosfolipase D; FAAH - ácido graxo amida hidrolase; DAGL- diacilglicerol lipase; CB1r - receptores do tipo 1; CB2r – receptor tipo 2.

Fonte: A autora, 2019.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, objetivamos compreender a hiperfagia da prole de machos e fêmeas no modelo experimental de animal desmamados precocemente, avaliando os sistemas dopaminérgico e endocanabinóide na idade adulta. No teste de preferência alimentar palatável, os machos do grupo DP apresentaram maior voracidade por gordura, embora esse perfil tenha sido alterado, uma vez que esses animais consumiram mais açúcar do que gordura ao final do teste. Os machos DP apresentaram alterações no sistema dopaminérgico que ajudaram a explicar esses achados, como menor D2r em NAc e DS. Em relação à ECS, observamos uma redução de FAAH e MAGL no LH de homens DP, sugerindo menor degradação de anandamida e 2-AG, respectivamente, o que é consistente com a hiperfagia detectada. Curiosamente, embora as fêmeas de DP não tenham apresentado diferenças na escolha de dietas palatáveis, elas mostraram alterações nos marcadores dos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide, o que sugere uma produção reduzida de dopamina e anandamida. Estes resultados estão descritos na Tabela 1.

Esse dimorfismo de gênero detectado no teste de preferência alimentar corrobora os resultados obtidos por Palou et al.(2010) em um modelo de programação devido a restrição energética durante a gestação; esses pesquisadores observaram maior consumo de dieta rica em açúcar após jejum de 12 horas em ratos machos adultos, mas não em fêmeas (PALOU et al., 2010). Para entender se as alterações encontradas no teste de preferência alimentar da prole programada pelo desmame precoce estiveram associadas ao sistema de recompensa, avaliamos os marcadores do sistema dopaminérgico em algumas regiões do cérebro porque a literatura descreve uma relação inversa entre a ingestão de alimentos e o sistema dopaminérgico, com hiperfagia e tônus dopaminérgico reduzido (PINHEIRO et al., 2015; CORWIN et al., 2016). Além disso, de acordo com Avena et al, a redução de D2r na NAc está relacionada à compulsão alimentar, aumento do consumo de dietas açucaradas e maior predisposição ao uso de drogas abusivas (AVENA, RADA, HOEBEL, 2009). Neste estudo, os machos do grupo DP exibiram menor D2r em NAc e DS, sugerindo menor efeito da dopamina nesses tecidos e, assim, explicando sua hiperfagia e preferência por dietas palatáveis. No hipotálamo, a sinalização dopaminérgica inibe a alimentação (HOEBEL et al., 2009). No entanto, em nosso estudo, o desmame precoce em animais adultos de ambos os sexos não programou o conteúdo de D2r no ARC. Sob uma dieta isocalórica padrão, as fêmeas DP aparentemente exibiram hiperfagia leve ao longo da vida (5% versus mulheres CONT), menor que a hiperfagia observada nos homens (15% vs homens CONT), que não refletia a escolha de dietas ricas em açúcar ou gordura.

Apesar desse achado, observamos uma redução de TH na VTA, redução de TH e D1r em NAc e redução de D2r em PFC, indicando uma possível redução na síntese e / ou ação da dopamina. Esses achados podem indicar o início da compulsão alimentar em fêmeas com DP. Além disso, outras vias do sistema de recompensa podem modular o fenótipo hiperfágico de animais do grupo DP de ambos os sexos, como opioides (SELLECK et al., 2018) ou oxitocina (IWASAKI et al., 2015), ambos diretamente relacionados à regulação da ingestão de alimentos.

Sabe-se que existe uma relação direta entre hiperfagia animal e elevação do tônus endocanabinóide central. Em relação à ECS no LH, os machos DP apresentaram níveis mais baixos de FAAH e MAGL em relação ao controle, enzimas responsáveis pela degradação da anandamida e 2AG, respectivamente, sugerindo que os endocanabinóides estão mais disponíveis neste núcleo, ou seja, estimulando a maior quantidade de alimentos. ingestão. Nas fêmeas DP, observamos níveis mais baixos de NAPE-PLD e níveis mais altos de FAAH, respectivamente, enzimas de síntese e degradação da anandamida. Esses achados são paradoxais, pois esperávamos que o ECS no LH também aumentasse nesses animais devido ao fenótipo de hiperfagia. É possível que a aparente diminuição da ação dopaminérgica ultrapasse a diminuição dos efeitos da ECS.

No tecido adiposo, os endocanabinóides atuam aumentando a formação e o armazenamento de triglicerídeos (PAGANO et al., 2007; SILVESTRI, LIGRESTI, DI MARZO, 2011; MACCARRONE et al., 2014). Kuipers et al. (2018) Estudaram a desregulação de endocanabinóides em ratos com obesidade induzida pela dieta e observaram aumento dos níveis séricos de anandamida e 2-AG e aumento da expressão gênica de DAGL na gordura gonadal (KUIPERS et al., 2018). Neste estudo, não encontramos alterações nos marcadores da ECS no tecido adiposo de ambos os sexos na prole programados pelo desmame precoce, o que é surpreendente, pois esses animais aumentaram a adiposidade visceral. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que os endocanabinóides circulantes sejam elevados em nosso modelo experimental.

No fígado, camundongos com ativação de CB1 exibem expressão gênica aumentada de SREBP-1c e enzimas lipogênicas, acetil-CoA carboxilase-1 e ácidos graxos sintase, e uma dieta rica em gordura aumenta os efeitos hepáticos da anandamida via CB1r (OSEI-HYIAMAN et al., 2005). Por outro lado, o CB2r exibe efeitos benéficos no fígado. Na cirrose, o CB2r é regulado positivamente nas células fibrogênicas e parece desempenhar um importante papel anti-fibrogênico e anti-inflamatório durante a lesão hepática crônica (JULIEN et al., 2005; XU et al., 2006; LOUVET et al., 2011). Conforme relatado anteriormente, machos adultos programados para desmame precoce apresentam estresse oxidativo e microsteatose hepática

(FRANCO et al., 2013). No presente estudo, observamos uma redução do CB2r no fígado da prole DP de ambos os sexos. Sugerimos que esse achado esteja relacionado à disfunção hepática descrita anteriormente em machos com desmamados precocemente. A mesma ideia é possível para as fêmeas DP, embora o equilíbrio redox e a morfologia do fígado ainda não tenham sido investigados nas fêmeas, a redução do CB2r pode levar ao desenvolvimento de esteatose hepática.

Até onde sabemos, este estudo é o primeiro a demonstrar que o desmame precoce induz alterações a longo prazo nos biomarcadores dos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide, explicando parcialmente o aumento do consumo alimentar dos animais e a maior preferência por alimentos palatáveis observado apenas nos machos. Dados os efeitos sexualmente dimórficos do DP na preferência alimentar palatável a longo prazo, são necessários estudos futuros de como os hormônios sexuais influenciam as alterações moleculares e comportamentais associadas ao DP.

Tabela 1 - Principais alterações induzidas pelo desmame precoce nas proles adultas de ambos os sexos

		♂	♀
TESTE DE PREFERÊNCIA ALIMENTAR			
30 minutos		↑ Hiperlipídica	S/A
12 horas		↑ Hiperglicídica	S/A
SISTEMA DOPAMINÉRGICO			
VTA	TH	S/A	↓
NAc	TH	S/A	↓
	D1r	S/A	↓
	D2r	↓	S/A
PFC	D2r	S/A	↓
DS	D2r	↓	S/A
SISTEMA ENDOCANABINÓIDE			
LH	NAPE-PLD	S/A	↓
	FAAH	↓	↑
	MAGL	↓	S/A
FÍGADO	CB2	↓	↓

CONCLUSÃO

Anteriormente o nosso grupo evidenciou que o modelo experimental de desmame precoce programa a prole adulta do sexo masculino para hiperfagia e aumento de gordura visceral. Aqui, pela primeira vez, observamos este mesmo fenótipo também nas fêmeas. Nesta Tese, conseguimos demonstrar que o desmame precoce induz alterações a longo prazo nos biomarcadores dos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide, que ajudam a explicar, pelo menos parcialmente, o aumento do consumo alimentar dos animais programados e a maior preferência alimentar por alimentos palatáveis apenas nos machos.

Quanto ao teste de preferência alimentar, observamos que os machos desmamados precocemente apresentaram maior voracidade pela dieta hiperlipídica, embora ao fim do teste, a sua preferência mude para dieta hiperglicídica. Em contrapartida, as fêmeas que são hiperfágicas ao logo da vida, não apresentaram alterações neste teste. Assim identificamos um dimorfismo sexual quanto a preferência por comida palatável. Neste contexto, nos questionamos se o teste poderia ter um resultado diferente, principalmente nas fêmeas, caso tivéssemos ofertado a opção por 3 dietas: rica em gordura, rica em açúcar e dieta padrão (normoprotéica, normolipídica e normoglicídica). Consideramos esta uma limitação do presente trabalho.

Sobre o sistema dopaminérgico, as proles de ambos os sexos apresentaram alterações sugestivas de menor síntese e/ou ação dopaminérgica, o que ajuda a compreender o desenvolvimento de hiperfagia neste modelo. Especificamente, detectamos nos machos redução de D2r (NAc e DS), enquanto as fêmeas exibiram redução de TH (VTA e NAc), redução de D1r (NAc) e redução de D2r (PFC). Quanto ao SEC, observamos no LH redução de FAAH e MAGL nos machos, sugerindo maior disponibilidade dos endocanabinóides e como consequência, maior estímulo ao consumo. Além disso, a redução de CB2 no fígado é sugestivo de esteatose hepática, conforme antes descrita neste modelo. Nas fêmeas desmamadas precocemente, os resultados do SEC foram paradoxais no LH, pois esperávamos pistas de hiperativação. No fígado das fêmeas, a redução de CB2 sugere que estas, conforme os machos, apresentem disfunções hepáticas. Uma limitação com relação ao SEC, diz respeito aos níveis circulantes de anandamida e 2AG, que não foram determinados no presente trabalho. No futuro, a dosagem destes endocanabinóides por HPLC traria mais informação sobre o nosso modelo.

Ressaltamos que aprofundar o estudo atual, focando, por exemplo, na análise da expressão genica dos biomarcadores dos dois sistemas de interesse e a avaliação da atividade

enzimática pode elucidar o que está ocorrendo em nosso modelo experimental. Outra possibilidade que não pode ser descartada é a participação de outros fatores no mecanismo de recompensa, como opióides e ocitocina.

Acreditamos que em conjunto, os achados desta Tese são de grande importância e despertam a necessidade de mais estudos e com outras técnicas para elucidar a relação entre os sistemas endocanabinóide e dopaminérgico no controle da ingestão de alimentos em modelos de obesidade programada com vistas tanto a prevenção como ao tratamento.

REFERÊNCIAS

- ABARIN, T., Y. YAN WU, N. WARRINGTON, S. LYE, et al. The impact of breastfeeding on FTO-related BMI growth trajectories: an application to the Raine pregnancy cohort study. **International journal of epidemiology**, 41, 6, 1650-1660. 2012.
- ALFERINK, J., S. SPECHT, H. ARENDS, B. SCHUMAK, et al. Cannabinoid receptor 2 modulates susceptibility to experimental cerebral malaria through a CCL17-dependent mechanism. **Journal of biological chemistry**, 291, 37, 19517-19531. 2016.
- ALMEIDA, M. M., C. P. DIAS-ROCHA, A. S. SOUZA, M. F. MUROS, et al. Perinatal maternal high-fat diet induces early obesity and sex-specific alterations of the endocannabinoid system in white and brown adipose tissue of weanling rat offspring. **The British journal of nutrition**, 118, 10, 788-803. 2017.
- ALSWAT, K. A. The role of endocannabinoids system in fatty liver disease and therapeutic potentials. **Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association**, 19, 4, 144. 2013.
- ALVHEIM, A. R., B. E. TORSTENSEN, Y. H. LIN, H. H. LILLEFOSSE, et al. Dietary linoleic acid elevates the endocannabinoids 2-AG and anandamide and promotes weight gain in mice fed a low fat diet. **Lipids**, 49, 1, 59-69. 2014.
- AVENA NM, RADA P, HOEBEL BG. Sugar and fat bingeing have notable differences in addictive-like behavior. **J Nutr**. 2009; 139(3), 623-628.
- BALSEVICH, G., G. N. PETRIE and M. N. HILL. Endocannabinoids: Effectors of glucocorticoid signaling. **Frontiers in neuroendocrinology**, 47, 86-108. 2017.
- BARKER, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. **Bmj**, 301, 6761, 1111. 1990.
- BARKER, D. J. The developmental origins of adult disease. **Journal of the American College of Nutrition**, 23, 6 Suppl, 588S-595S. 2004.
- BARKER, D. J. The developmental origins of adult disease. **Journal of the American College of Nutrition**, 23, 6 Suppl, 588S-595S. 2004.
- BASSAREO, V. and G. DI CHIARA. Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. **Neuroscience**, 89, 3, 637-641. 1999.
- BASTIEN, M., P. POIRIER, I. LEMIEUX and J. P. DESPRES. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. **Progress in cardiovascular diseases**, 56, 4, 369-381. 2014.
- BERMUDEZ-SILVA, F. J., P. CARDINAL and D. COTA. The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. **Journal of psychopharmacology**, 26, 1, 114-124. 2012.

BERRIDGE, K. C. Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 20, 1, 1-25. 1996.

BERRIDGE, K. C. 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiology & behavior*, 97, 5, 537-550. 2009.

BERTHOUD, H.-R. Neural control of appetite: cross-talk between homeostatic and non-homeostatic systems. *Appetite*, 43, 3, 315-317. 2004.

BERTHOUD, H. R. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity*, 14, S8, 197S-200S. 2006.

BISWAS, K. K., K. P. SARKER, K. ABEYAMA, K. KAWAHARA, et al. Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis. *Hepatology*, 38, 5, 1167-1177. 2003.

BLOCK, T. and A. EL-OSTA. Epigenetic programming, early life nutrition and the risk of metabolic disease. *Atherosclerosis*, 266, 31-40. 2017.

Bloomfield MA, Ashok AH, Volkow ND, Howes OD. The effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol on the dopamine system. *Nature*. 2016; 539(7629), 369-377.

BONOMO, I. T., P. C. LISBOA, M. C. PASSOS, S. B. ALVES, et al. Prolactin inhibition at the end of lactation programs for a central hypothyroidism in adult rat. *The Journal of endocrinology*, 198, 2, 331-337. 2008.

BONOMO, I. T., P. C. LISBOA, A. R. PEREIRA, M. C. PASSOS, et al. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *The Journal of endocrinology*, 192, 2, 339-344. 2007.

BOSIER, B., G. G. MUCCIOLI, E. HERMANS and D. M. LAMBERT. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochemical pharmacology*, 80, 1, 1-12. 2010.

BUHMANN, H., C. W. LE ROUX and M. BUETER. The gut-brain axis in obesity. Best practice & research. *Clinical gastroenterology*, 28, 4, 559-571. 2014.

CABRAL, G. A. and L. GRIFFIN-THOMAS. Emerging role of the cannabinoid receptor CB 2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert reviews in molecular medicine*, 11, 2009.

CAO, Z., M. M. MULVIHILL, P. MUKHOPADHYAY, H. XU, et al. Monoacylglycerol lipase controls endocannabinoid and eicosanoid signaling and hepatic injury in mice. *Gastroenterology*, 144, 4, 808-817 e815. 2013.

CARACENI, P., A. VIOLA, F. PISCITELLI, F. GIANNONE, et al. Circulating and hepatic endocannabinoids and endocannabinoid-related molecules in patients with cirrhosis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 30, 6, 816-825. 2010.

CARDINAL, P., L. BELLOCCHIO, S. CLARK, A. CANNICH, et al. Hypothalamic CB1 cannabinoid receptors regulate energy balance in mice. **Endocrinology**, 153, 9, 4136-4143. 2012.

CASCIO, M. G. and P. MARINI. Biosynthesis and fate of endocannabinoids. **Endocannabinoids**, 39-58. 2015.

CASTILLO, P. E., T. J. YOUNTS, A. E. CHAVEZ and Y. HASHIMOTODANI. Endocannabinoid signaling and synaptic function. **Neuron**, 76, 1, 70-81. 2012.

COTA, D., G. MARSICANO, M. TSCHOP, Y. GRUBLER, et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. **The Journal of clinical investigation**, 112, 3, 423-431. 2003.

CORWIN RL, WOJNICKI FH, ZIMMER DJ, ET AL. Binge-type eating disrupts dopaminergic and GABAergic signaling in the prefrontal cortex and ventral tegmental area. **Obesity (Silver Spring)**. 2016; 24(10), 2118-2125.

CRISTINO, L., T. BECKER and V. DI MARZO. Endocannabinoids and energy homeostasis: an update. **BioFactors**, 40, 4, 389-397. 2014.

D'ADDARIO, C., M. M. DI BONAVENTURA, M. PUCCI, A. ROMANO, et al. Endocannabinoid signaling and food addiction. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 47, 203-224. 2014.

DA SILVA LIMA, N., E. G. DE MOURA, M. C. F. PASSOS, J. F. N. NETO, et al. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. **British journal of nutrition**, 105, 9, 1405-1413. 2011.

DAI, E., L. ZHANG, L. YE, S. WAN, et al. Hepatic expression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlate with fibrogenesis in patients with chronic hepatitis B. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, 59, 124-130. 2017.

DE ALBUQUERQUE MAIA, L., P. C. LISBOA, E. DE OLIVEIRA, N. DA SILVA LIMA, et al. Bone metabolism in obese rats programmed by early weaning. **Metabolism: clinical and experimental**, 63, 3, 352-364. 2014.

DE MACEDO, I. C., J. S. DE FREITAS and I. L. DA SILVA TORRES. The influence of palatable diets in reward system activation: a mini review. **Advances in pharmacological sciences**, 2016, 2016.

DE MOURA, E. G., I. T. BONOMO, J. F. NOGUEIRA-NETO, E. DE OLIVEIRA, et al. Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. **The Journal of physiology**, 587, Pt 20, 4919-4929. 2009.

DEMIZIEUX L, PISCITELLI F, TROY-FIORAMONTI S, et al. Early Low-Fat Diet Enriched With Linolenic Acid Reduces Liver Endocannabinoid Tone and Improves Late

Glycemic Control After a High-Fat Diet Challenge in Mice. **Diabetes**. 2016; 65(7), 1824-1837.

DEVEAUX, V., T. CADOU DAL, Y. ICHIGOTANI, F. TEIXEIRA-CLERC, et al. Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic steatosis. **PloS one**, 4, 6, e5844. 2009.

DI MARZO, V., N. STELLA and A. ZIMMER. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. **Nature Reviews Neuroscience**, 16, 1, 30. 2015.

DÖRNER, G. and A. PLAGEMANN. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. **Hormone and Metabolic Research**, 26, 05, 213-221. 1994.

ECKARDT, K., H. SELL, A. TAUBE, M. KOENEN, et al. Cannabinoid type 1 receptors in human skeletal muscle cells participate in the negative crosstalk between fat and muscle. **Diabetologia**, 52, 4, 664-674. 2009.

EGECIOGLU, E., K. P. SKIBICKA, C. HANSSON, M. ALVAREZ-CRESPO, et al. Hedonic and incentive signals for body weight control. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, 12, 3, 141-151. 2011.

EMAMI, A., M. R. DOS SANTOS, S. D. ANKER, S. VON HAEHLING, et al. Concerning the Role of Gender Difference in Obesity Paradox in Patients With Heart Failure. **JACC. Heart failure**, 4, 3, 235-236. 2016.

FAIENZA, M. F., D. Q. WANG, G. FRUHBECK, G. GARRUTI, et al. The dangerous link between childhood and adulthood predictors of obesity and metabolic syndrome. **Internal and emergency medicine**, 11, 2, 175-182. 2016.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J., C. GARCÍA, O. SAGREDO, M. GÓMEZ-RUIZ, et al. The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage. **Expert opinion on therapeutic targets**, 14, 4, 387-404. 2010.

FANCO JG, LISBOA PC, LIMA NS, et al. Resveratrol attenuates oxidative stress and prevents steatosis and hypertension in obese rats programmed by early weaning. **J Nutr Biochem**. 2013; 24(6), 960-966.

FRAGA, M. C., E. G. MOURA, J. O. SILVA, I. T. BONOMO, et al. Maternal prolactin inhibition at the end of lactation affects learning/memory and anxiety-like behaviors but not novelty-seeking in adult rat progeny. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, 100, 1, 165-173. 2011.

FRANCISCHETTI, E. A., V. G. D. ABREU and G. VIRGINIA. O sistema endocanabinóide: nova perspectiva no controle de fatores de risco cardiometabólico. **Arq. Bras. Cardiol**, 87, 548-558. 2006.

GHANEMI, A., A. MELOUANE, O. MUCUNGUZI, M. YOSHIOKA, et al. Energy and metabolic pathways in trefoil factor family member 2 (Tff2) KO mice beyond the protection from high-fat diet-induced obesity. **Life sciences**, 215, 190-197. 2018.

GONZALEZ-MUNIESA, P., M. A. MARTINEZ-GONZALEZ, F. B. HU, J. P. DESPRES, et al. Obesity. **Nature reviews. Disease primers**, 3, 17034. 2017.

GRAY, J. M., C. D. WILSON, T. T. LEE, Q. J. PITTMAN, et al. Sustained glucocorticoid exposure recruits cortico-limbic CRH signaling to modulate endocannabinoid function. **Psychoneuroendocrinology**, 66, 151-158. 2016.

HAJNAL, A., G. P. SMITH and R. NORNGREN. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 286, 1, R31-R37. 2004.

HANLON, E. C., B. A. BALDO, K. SADEGHIAN and A. E. KELLEY. Increases in food intake or food-seeking behavior induced by GABAergic, opioid, or dopaminergic stimulation of the nucleus accumbens: is it hunger? **Psychopharmacology**, 172, 3, 241-247. 2004.

HANUŠ, L. O. Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo) cannabinoids. **Medicinal research reviews**, 29, 2, 213-271. 2009.

HARDER T, BERGMANN R, KALLISCHNIGG G, PLAGEMANN A. Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. **Am J Epidemiol**. 2005; 162(5), 397-403.

HAVERMANS, R. C. "You Say it's Liking, I Say it's Wanting...". On the difficulty of disentangling food reward in man. **Appetite**, 57, 1, 286-294. 2011.

HOEBEL BG, HERNANDEZ L, SCHWARTZ DH, MARK GP, HUNTER GA. Microdialysis studies of brain norepinephrine, serotonin, and dopamine release during ingestive behavior. Theoretical and clinical implications. **Ann N Y Acad Sci**. 1989; 575, 171-191.

HORTA, B. L., C. LORET DE MOLA and C. G. VICTORA. Breastfeeding and intelligence: a systematic review and meta-analysis. **Acta paediatrica**, 104, 14-19. 2015.

HORTA, B. L., C. G. VICTORA, G. V. FRANÇA, F. P. HARTWIG, et al. Breastfeeding moderates FTO related adiposity: a birth cohort study with 30 years of follow-up. **Scientific reports**, 8, 1, 2530. 2018.

HORTON, J. D., I. SHIMOMURA, M. S. BROWN, R. E. HAMMER, et al. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. **The Journal of clinical investigation**, 101, 11, 2331-2339. 1998.

HUANG, L., M. A. QUINN, G. A. FRAMPTON, L. E. GOLDEN, et al. Recent advances in the understanding of the role of the endocannabinoid system in liver diseases. **Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, 43, 3, 188-193. 2011.

IWASAKI Y, MAEJIMA Y, SUYAMA S, et al. Peripheral oxytocin activates vagal afferent neurons to suppress feeding in normal and leptin-resistant mice: a route for ameliorating

hyperphagia and obesity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2015; 308(5), R360-369.

IZZO, A. A. and E. ERNST. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs. **Drugs**, 69, 13, 1777-1798. 2009.

JO, Y. H., D. WIEDL and L. W. ROLE. Cholinergic modulation of appetite-related synapses in mouse lateral hypothalamic slice. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 25, 48, 11133-11144. 2005.

JULIEN B, GRENARD P, TEIXEIRA-CLERC F, et al. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. **Gastroenterology.** 2005; 128(3), 742-755.

KEATING, S. T. and A. EL-OSTA. Epigenetics and metabolism. **Circulation research**, 116, 4, 715-736. 2015.

KELLEY, A., M. WILL, T. STEININGER, M. ZHANG, et al. Restricted daily consumption of a highly palatable food (chocolate Ensure®) alters striatal enkephalin gene expression. **European Journal of Neuroscience**, 18, 9, 2592-2598. 2003.

KILOV, D. and G. KILOV. Philosophical determinants of obesity as a disease. **Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, 19, 1, 41-48. 2018.

KITAHARA, C. M., A. J. FLINT, A. BERRINGTON DE GONZALEZ, L. BERNSTEIN, et al. Association between class III obesity (BMI of 40-59 kg/m²) and mortality: a pooled analysis of 20 prospective studies. **PLoS medicine**, 11, 7, e1001673. 2014.

KOWALSKI, T. J., A. M. STER and G. P. SMITH. Increased hypothalamic neuropeptide Y expression in deprived preweanling rats is reversed by intragastric infusion of milk. **Physiology & behavior**, 75, 3, 425-432. 2002.

KUIPERS EN, KANTAE V, MAARSE BCE, et al. High Fat Diet Increases Circulating Endocannabinoids Accompanied by Increased Synthesis Enzymes in Adipose Tissue. **Front Physiol.** 2018; 9, 1913.

LEE, Y., J. JO, H. Y. CHUNG, C. POTHOUKAKIS, et al. Endocannabinoids in the gastrointestinal tract. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 311, 4, G655-G666. 2016.

LIMA NDA S, DE MOURA EG, PASSOS MC et al. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. **Br J Nutr**, 2011;105(9): 1405-1413.

LIMA, N. S., E. G. MOURA, J. G. FRANCO, C. R. PINHEIRO, et al. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, 45, 1, 22-30. 2013.

- LIPINA, C. and H. S. HUNDAL. Modulation of cellular redox homeostasis by the endocannabinoid system. **Open biology**, 6, 4, 150276. 2016.
- LOUVET A, TEIXEIRA-CLERC F, CHOBERT MN, et al. Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. **Hepatology**. 2011; 54(4), 1217-1226.
- LUTTER, M. and E. J. NESTLER. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. **The Journal of nutrition**, 139, 3, 629-632. 2009.
- MACCARRONE M, GUZMAN M, MACKIE K, et al. Programming of neural cells by (endo)cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. **Nat Rev Neurosci**. 2014; 15(12), 786-801.
- MAHLER, S. V., K. S. SMITH and K. C. BERRIDGE. Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of **Neuropsychopharmacology**, 32, 11, 2267-2278. 2007.
- MALDONADO, R., O. VALVERDE and F. BERRENDERO. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. **Trends in neurosciences**, 29, 4, 225-232. 2006.
- MAZIER, W., N. SAUCISSE, B. GATTA-CHERIFI and D. COTA. The endocannabinoid system: pivotal orchestrator of obesity and metabolic disease. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 26, 10, 524-537. 2015.
- MILLER, S., S. KULKARNI, A. CIESIELSKI, S. P. NIKAS, et al. Controlled-Deactivation CB1 Receptor Ligands as a Novel Strategy to Lower Intraocular Pressure. **Pharmaceuticals**, 11, 2, 2018.
- MORTON, G., D. CUMMINGS, D. BASKIN, G. BARSH, et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, 443, 7109, 289. 2006.
- NAKATA, M. and T. YADA. Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca²⁺ oscillation in islet beta-cells via CB1 receptors. **Regulatory peptides**, 145, 1-3, 49-53. 2008.
- NG, M., T. FLEMING, M. ROBINSON, B. THOMSON, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, 384, 9945, 766-781. 2014.
- OHNO-SHOSAKU, T. and M. KANO. Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. **Current opinion in neurobiology**, 29, 1-8. 2014.
- OLIVEIRA, A. I., C. JERONIMO and R. HENRIQUE. Moving forward in bladder cancer detection and diagnosis: the role of epigenetic biomarkers. **Expert review of molecular diagnostics**, 12, 8, 871-878. 2012.
- ORNELLAS, F., P. V. CARAPETO, C. A. MANDARIM-DE-LACERDA and M. B. AGUILA. Obese fathers lead to an altered metabolism and obesity in their children in adulthood: review of experimental and human studies. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, 93, 6, 551-559. 2017.

OSEI-HYIAMAN, D., M. DEPETRILLO, P. PACHER, J. LIU, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB 1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. **The Journal of clinical investigation**, 115, 5, 1298-1305. 2005.

PAGANO C, PILON C, CALCAGNO A, et al. The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. **J Clin Endocrinol Metab.** 2007; 92(12), 4810-4819.

PALOU, A., C. PICO and M. L. BONET. The molecular basis of body weight control. **Forum of nutrition**, 56, 164-168. 2003.

PALOU M, PRIEGO T, SANCHEZ J, et al. Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance. **Nutr Metab.** 2010; 7, 69.

PARFIENIUK, A. and R. FLISIAK. Role of cannabinoids in chronic liver diseases. **World journal of gastroenterology**, 14, 40, 6109-6114. 2008.

PERTWEE, R. G. Endocannabinoids and their pharmacological actions. **Endocannabinoids**, 1-37. 2015.

PINHEIRO, C. R., E. G. MOURA, A. C. MANHAES, M. C. FRAGA, et al. Concurrent maternal and pup postnatal tobacco smoke exposure in Wistar rats changes food preference and dopaminergic reward system parameters in the adult male offspring. **Neuroscience**, 301, 178-192. 2015.

PINHEIRO, C. R., E. G. MOURA, A. C. MANHAES, M. C. FRAGA, et al. Maternal nicotine exposure during lactation alters food preference, anxiety-like behavior and the brain dopaminergic reward system in the adult rat offspring. **Physiology & behavior**, 149, 131-141. 2015.

RAKOVSKA, A., M. BARANYI, K. WINDISCH, P. PETKOVA-KIROVA, et al. Neurochemical evidence that cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) 55–102 peptide modulates the dopaminergic reward system by decreasing the dopamine release in the mouse nucleus accumbens. **Brain research bulletin**, 134, 246-252. 2017.

REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC, JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr** 1993;123(11): 1939-1951.

REYNOLDS LJ, CHAVAN NR, DEHOFF LB, et al. Smoking during pregnancy increases chemerin expression in neonatal tissue. **Exp Physiol.** 2019; 104(1), 93-99.

RIBEIRO, G. and O. SANTOS. Recompensa alimentar: mecanismos envolvidos e implicações para a obesidade. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, 8, 2, 82-88. 2013.

ROM, S. and Y. PERSIDSKY. Cannabinoid receptor 2: potential role in immunomodulation and neuroinflammation. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, 8, 3, 608-620. 2013.

- RUBY, M. A., D. K. NOMURA, C. S. HUDAK, A. BARBER, et al. Acute overactive endocannabinoid signaling induces glucose intolerance, hepatic steatosis, and novel cannabinoid receptor 1 responsive genes. **PloS one**, 6, 11, e26415. 2011.
- RYBERG, E., N. LARSSON, S. SJÖGREN, S. HJORTH, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. **British journal of pharmacology**, 152, 7, 1092-1101. 2007.
- SANCHEZ-FUENTES, A., B. A. MARICHAL-CANCINO, M. MENDEZ-DIAZ, A. L. BECERRIL-MELENDZ, et al. mGluR1/5 activation in the lateral hypothalamus increases food intake via the endocannabinoid system. **Neuroscience letters**, 631, 104-108. 2016.
- SAPER, C. B., T. C. CHOU and J. K. ELMQUIST. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. **Neuron**, 36, 2, 199-211. 2002.
- SELLAYAH D, CAGAMPANG FR. The Divergent Effect of Maternal Protein Restriction during Pregnancy and Postweaning High-Fat Diet Feeding on Blood Pressure and Adiposity in Adult Mouse Offspring. **Nutrient**. 2018; 10(12).
- SELLECK RA, ZHANG W, SAMBERG HD, et al. Limited prefrontal cortical regulation over the basolateral amygdala in adolescent rats. **Sci Rep**. 2018; 8(1), 17171.
- SIEGMUND, S. V. and R. F. SCHWABE. Endocannabinoids and liver disease. II. Endocannabinoids in the pathogenesis and treatment of liver fibrosis. **American journal of physiology**. Gastrointestinal and liver physiology, 294, 2, G357-362. 2008.
- SILVESTRI C, LIGRESTI A, DI MARZO V. Peripheral effects of the endocannabinoid system in energy homeostasis: adipose tissue, liver and skeletal muscle. **Rev Endocr Metab Disord**. 2011; 12(3), 153-162.
- SILVESTRI, C. and V. DI MARZO. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell metabolism*, 17, 4, 475-490. 2013.
- STICE, E., S. YOKUM, K. BLUM and C. BOHON. Weight gain is associated with reduced striatal response to palatable food. **Journal of Neuroscience**, 30, 39, 13105-13109. 2010.
- SUÁREZ, A. I. T., A. I. F. SÁNCHEZ and A. FERNÁNDEZ-CARBALLIDO. Cannabinoides: una prometedora herramienta para el desarrollo de nuevas terapias. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, 80, 3, 2014.
- SWINBURN, B., G. SACKS and E. RAVUSSIN. Increased food energy supply is more than sufficient to explain the US epidemic of obesity. **The American journal of clinical nutrition**, 90, 6, 1453-1456. 2009.
- TAM, J., R. CINAR, J. LIU, G. GODLEWSKI, et al. Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance. **Cell metabolism**, 16, 2, 167-179. 2012.
- TAVERAS, E. M., K. S. SCANLON, L. BIRCH, S. L. RIFAS-SHIMAN, et al. Association of breastfeeding with maternal control of infant feeding at age 1 year. **Pediatrics**, 114, 5, e577-583. 2004.

- TOMINAGA, M. and T. TOMINAGA. Structure and function of TRPV1. **Pflügers Archiv**, 451, 1, 143-150. 2005.
- TOSCHKE, A. M., R. M. MARTIN, R. VON KRIES, J. WELLS, et al. Infant feeding method and obesity: body mass index and dual-energy X-ray absorptiometry measurements at 9-10 y of age from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). **The American journal of clinical nutrition**, 85, 6, 1578-1585. 2007.
- URANGA, R. M. and J. KELLER. The Complex Interactions Between Obesity, Metabolism and the Brain. **Frontiers in neuroscience**, 13, 513. 2019.
- VALLONE, D., R. PICETTI and E. BORRELLI. Structure and function of dopamine receptors. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, 24, 1, 125-132. 2000.
- VAN MINH, H., K. B. GIANG, N. B. NGOC, P. T. HAI, et al. Prevalence of tobacco smoking in Vietnam: findings from the Global Adult Tobacco Survey 2015. **International journal of public health**, 62, Suppl 1, 121-129. 2017.
- VECCHIÉ, A., F. DALLEGRI, F. CARBONE, A. BONAVENTURA, et al. Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. **European journal of internal medicine**, 48, 6-17. 2018.
- VOLKOW, N. D., G.-J. WANG, F. TELANG, J. S. FOWLER, et al. Low dopamine striatal D2 receptors are associated with prefrontal metabolism in obese subjects: possible contributing factors. **NeuroImage**, 42, 4, 1537-1543. 2008.
- WANG, G.-J., N. D. VOLKOW, J. LOGAN, N. R. PAPPAS, et al. Brain dopamine and obesity. **The Lancet**, 357, 9253, 354-357. 2001.
- WATKINS, B. A. and J. KIM. The endocannabinoid system: directing eating behavior and macronutrient metabolism. **Frontiers in psychology**, 5, 1506. 2015.
- WHO, U. UNU. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control, a guide for programme managers. Geneva: **World Health Organization**, 2001.
- WHO, U. UNU. 10 facts on breastfeeding. **World Health Organization**, 2012.
- WILLIAMS EP, MESIDOR M, WINTERS K, ET AL. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. **Curr Obes Rep**. 2015; 4(3), 363-370.
- Xu X, Liu Y, Huang S, et al. Overexpression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006; 171(1), 31-38.
- YOUNES-RAPOZO, V., E. G. DE MOURA, N. DA SILVA LIMA, P. C. BARRADAS, et al. Early weaning is associated with higher neuropeptide Y (NPY) and lower cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in the paraventricular nucleus (PVN) in adulthood. **The British journal of nutrition**, 108, 12, 2286-2295. 2012.

YOUNES-RAPOZO, V., E. G. MOURA, A. C. MANHAES, N. PEIXOTO-SILVA, et al.
Early weaning by maternal prolactin inhibition leads to higher neuropeptide Y and
astrogliosis in the hypothalamus of the adult rat offspring. **The British journal of nutrition**,
113, 3, 536-545. 2015.