

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Ação central do CART no hipotálamo de
camundongos com obesidade induzida por dieta
hiperlipídica: um estudo neuroanatômico**

Deborah de Paula Romeu

Trabalho apresentado à disciplina Trabalho de
Conclusão Curso II – 0060029, como requisito
parcial para a graduação no Curso de Nutrição
da FSP/USP.

Orientador: Prof. Assoc. Vagner Roberto
Antunes

São Paulo
2017

Ação central do CART no hipotálamo de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica: um estudo neuroanatômico

Deborah de Paula Romeu

Trabalho apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão Curso II – 0060029, como requisito parcial para a graduação no Curso de Nutrição da FSP/USP.

Orientador: Prof. Assoc. Vagner Roberto Antunes

São Paulo
2017



RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO - TCC

Aluno		Nº USP
Título do TCC		
Local da defesa		Data: ___ / ___ / ____

Banca Examinadora		
Examinador 1		Nº USP
Examinador 2		Nº USP
Orientador		Nº USP

Após a apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso, de acordo com as diretrizes para elaboração do TCC do Curso de Nutrição da FSP/USP, a Banca Examinadora passou à arguição pública e, encerrados os trabalhos, os examinadores deram o parecer final:

_____ Nota: _____
(Examinador 1)

_____ Nota: _____
(Examinador 2)

_____ Nota: _____
(Orientador e Presidente da Banca)

Resultado Final: Nota: _____ <input type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado	_____ Nome do Responsável pelo Relatório
---	--



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Estudo dos efeitos da ação central do CART nas variáveis cardiovasculares de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica*", registrado sob o protocolo nº **88/**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **29/9/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Vagner Roberto Antunes**

- Membros da Equipe: *Deborah de Paula Romeu (Iniciação científica), Laiali Jurdi El Chaa (Pós-graduando)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE


We hereby certify that the project entitled "*Evaluation of central effect of CART on cardiovascular parameters of diet-induced obesity mice*", protocol nº **88/**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **9/29/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

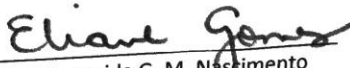
- Principal Investigator: **Dr.(a.) Vagner Roberto Antunes**

- Team members: *Deborah de Paula Romeu (Undergraduate Student), Laiali Jurdi El Chaa (Graduate Student)*

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57bl/6	Macho/male	2 meses/months	60


Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP


Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho ao meu pai, que
partiu (muito) antes do combinado.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me guardado e me guiado durante esta jornada.

Aos meus pais, Pasqual (*in memoriam*) e Soraya, por terem sido meu porto seguro e por terem feito o impossível para que eu perseguisse meus sonhos.

À Universidade de São Paulo por ter proporcionado o meu desenvolvimento acadêmico ao longo desses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro durante a minha iniciação científica, a partir da qual originou-se este trabalho.

Ao meu orientador, prof. Vagner Roberto Antunes, por sempre ter acreditado em mim, por toda a assistência, compreensão e incentivo, e por ter acompanhado meu crescimento durante a minha graduação. Conhecê-lo foi realmente um privilégio.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à nossa técnica Luciene (Teca) Ribeiro pela imensa ajuda nos experimentos.

À Talita de Melo e Silva e Natália Ribeiro por me ensinarem seus métodos de imunohistoquímica.

Ao laboratório da professora Ana Carolina Thomaz Takakura por ceder o micrótomo para a realização dos cortes histológicos.

Ao laboratório da professora Carla Roberta de Oliveira Carvalho por ceder o microscópio para a quantificação da imunohistoquímica.

Por fim, a todos os amigos que me apoiaram e me confortaram.

“Mas sede fortes, e não desfaleçam as vossas mãos, porque a vossa obra terá recompensa”

2 Crônicas 15:7

Romeu DP. Ação central do CART no hipotálamo de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica: um estudo neuroanatômico [Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Nutrição]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2017.

RESUMO

Introdução – O transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) é um peptídeo amplamente distribuindo no sistema nervoso central (SNC), envolvido no comportamento alimentar, mas que também tem seu papel no controle cardiovascular. A literatura mostra que a administração central de CART pode levar a aumentos significativos na pressão arterial. Além desses dados, estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que camundongos obesos e hipertensos apresentam uma expressão aumentada de CART no núcleo dorsomedial do hipotálamo. Portanto, nossa hipótese é de que o CART pode agir de maneira diferente no SNC de animais obesos e eutróficos, ativando diferentes núcleos encefálicos, em especial núcleos hipotalâmicos. **Objetivo** – Avaliar a ação do CART em núcleos hipotalâmicos envolvidos diretamente com a circuitaria neuronal do sistema nervoso autônomo, e as possíveis diferenças entre a ação desse neuropeptídeo em animais eutróficos e obesos. **Métodos** – Camundongos machos da linhagem C57BL/6 foram separados em dois grandes grupos: eutrófico, expostos a uma dieta comum, e obeso, expostos a uma dieta hiperlipídica (HL). O peso corporal e o consumo alimentar foram monitorados durante oito semanas. Foi realizado um teste de tolerância à glicose próximo ao fim do período de dieta. Terminado esse período, uma cânula-guia foi inserida no ventrículo lateral cerebral (VL) para a microinjeção de CART a 400 μ M, 1mM ou veículo tanto no grupo obeso como no grupo eutrófico. Depois de 90 minutos, os camundongos foram anestesiados e perfundidos transcardiamente para fixar o tecido cerebral. Esse tecido foi processado em um micrótomo em cortes de 40 μ m seguido da realização de imunohistoquímica para detectar a proteína FOS. Foram selecionados cortes de níveis representativos dos núcleos que expressaram imunorreatividade à FOS (FOS-ir), sendo que cada núcleo foi quantificado de forma

unilateral por meio do *software* ImageJ. Os resultados decorrentes da exposição à dieta HL foram analisados pelo teste *t* de Student não-pareado ou pela análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Bonferroni. A comparação entre a FOS-ir apresentada pelos diferentes grupos foi analisada pela ANOVA de duas vias com pós-teste de Dunnett. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados – Após oito semanas consumindo a dieta HL, o grupo obeso apresentou um maior peso corporal e adiposidade ($p < 0,05$), além de tolerância à glicose prejudicada ($p < 0,05$ na área sob a curva) em relação ao grupo eutrófico. A administração de CART via VL resultou em uma FOS-ir nos núcleos paraventricular (PVN), dorsomedial (DMH), arqueado (ARC) e ventromedial (VMH) do hipotálamo. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) para a FOS-ir observada no PVN e DMH dos camundongos do grupo obeso que receberam CART na concentração mais alta, ou seja, a 1mM. **Conclusões** – A ação central do CART parece ser mais efetiva no hipotálamo de camundongos obesos, em especial em núcleos autonômicos relacionados ao controle cardiovascular, o que é um indicativo de que o CART deve desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da hipertensão na obesidade.

Descritores: Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina; Hipotálamo; Dieta hiperlipídica; Obesidade; Hipertensão.

LISTA DE SIGLAS

AgRP	Peptídeo relacionado ao gene Agouti
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
CART	Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAB	Diaminobenzidina tetrahidrocloro
DMH	Núcleo dorsomedial do hipotálamo
GTT	Teste de tolerância à glicose
ICV	Intracerebroventricular
IML	Coluna intermédio-lateral
KPBS	Tampão fosfato de potássio
LHA	Área hipotalâmica lateral
NaPBS	Tampão fosfato de sódio
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFA	Paraformaldeído
POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RNA _m	RNA mensageiro
RVLM	Bulbo rostroventrolateral
SNC	Sistema nervoso central
VET	Valor energético total
VL	Ventrículo lateral cerebral
VMH	Núcleo ventromedial do hipotálamo
α -MSH	Hormônio estimulador do melanócito

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	
1.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
1.2 JUSTIFICATIVA.....	15
2 OBJETIVO.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 ANIMAIS	17
3.2 DIETAS.....	17
3.3 PARÂMETROS ZOOMÉTRICOS	18
3.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)	18
3.5 IMPLANTE DE CÂNULA-GUIA INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV)....	19
3.6 MICROINJEÇÃO DE CART	20
3.7 PERFUSÃO TRANSCARDÍACA	20
3.8 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	21
3.9 QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS À FOS	22
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	23
4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS ATIVADOS PELA AÇÃO CENTRAL DO CART EM ANIMAIS EUTRÓFICOS E OBESOS.....	24
5 RESULTADOS	26
5.1 GANHO DE PESO E ADIPOSIDADE RESULTANTES DO CONSUMO DE DIETA HL	26
5.2 CONSUMO DE RAÇÃO E CONSUMO ENERGÉTICO	28
5.3 EFEITOS DA DIETA HL NA HOMEOSTASE GLICÊMICA	28
5.4 ATIVAÇÃO DE NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS PELA AÇÃO CENTRAL DO CART.....	29
5 DISCUSSÃO.....	33
6 CONCLUSÃO.....	35
7 IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA NO CAMPO DE ATUAÇÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017), obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal que é um fator de risco para diversas patologias, sendo, portanto, prejudicial à saúde de um indivíduo. O sobrepeso e a obesidade, antes considerados problemas característicos de países desenvolvidos, hoje se estendem a países emergentes, como confirmam os dados recentes disponibilizados pela OMS (2017). Em 2014, 39% da população mundial acima de 18 anos apresentava sobrepeso, enquanto 13% já era obesa. Tais problemas têm causado mais mortes do que a desnutrição (OMS, 2017).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde mostram que 50,8% da população adulta já apresenta excesso de peso e 17,5%, obesidade (VIGITEL, 2013). O alerta acerca de tais números acentua-se diante do cenário atual, propício ao desenvolvimento da obesidade: nosso sistema alimentar é falho a ponto de promover uma nutrição duplamente deficiente: privilegiando a ingestão alimentar exacerbada e negligenciando a desnutrição (SWINBURN *et al.*, 2011). Isso se dá através de uma abundante oferta de alimentos calóricos e de baixo custo, aliada a um estilo de vida que favorece o sedentarismo em detrimento do gasto energético (HILL, 1998).

A obesidade é fator de risco para outros problemas de saúde como dificuldades respiratórias, debilidades ortopédicas, infertilidade, resistência à insulina, além de distúrbios psicológicos e até certos tipos de câncer e doenças cardiovasculares, dentre elas hipertensão (OMS, 1998). No indivíduo, o índice de massa corporal (IMC) tem uma associação com os níveis de pressão arterial (PA), mesmo com o valor do IMC dentro da normalidade, ou mesmo abaixo (JONES, 1996), sendo que a perda de peso pode diminuir os níveis de pressão arterial, e o ganho pode subir esses níveis (MONTANI *et al.*, 2002). Sendo assim, um indivíduo obeso tem suas chances aumentadas de tornar-se hipertenso (MONTANI *et al.*, 2002).

A hipertensão é identificada quando a pressão arterial sistólica for ≥ 140 mmHg e/ou a pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg (OMS, 2013). Atualmente, esse quadro acomete cerca de 40% da população mundial acima de 25 anos, sendo responsável por cerca de 9,4 milhões de mortes no mundo em 2010 (LIM *et al.* 2012).

Durante muitos anos houve um dogma de que o controle da pressão arterial em longo prazo e suas alterações (hipertensão) estava direta e exclusivamente relacionado à função renal (GUYTON *et al.* 1972; GUYTON, 1989). No entanto, sabe-se que o sistema nervoso autônomo (SNA), que antigamente era relacionado somente ao controle em curto prazo da PA, atualmente exerce um papel fundamental também no controle em longo prazo do sistema cardiovascular e suas disfunções estão diretamente relacionados ao aparecimento dos quadros hipertensivos (ESLER *et al.*, 2010; NAVAR, 2010), sendo esta patologia classificada como hipertensão neurogênica.

O SNA é subdividido em uma porção simpática e outra parassimpática e participa de várias funções no organismo, dentre elas o controle da pressão arterial e do balanço energético. Dados da literatura mostram que há uma hiperativação do sistema nervoso simpático (SNS) na obesidade (SOWERS *et al.*, 1982; SCHERRER *et al.*, 1994; GRASSI *et al.*, 2001) e na hipertensão (GRASSI *et al.*, 2010). O SNS exerce influência sobre a pressão arterial por meio de uma circuitaria envolvendo diversos núcleos do sistema nervoso central (SNC), com destaque para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e áreas do tronco encefálico como o núcleo do trato solitário (NTS) e o bulbo rostroventrolateral (RVLM), ou grupamento catecolaminérgico (C1) do bulbo.

No tronco encefálico, os núcleos, tais como NTS, RVLM, o bulbo caudoventrolateral (CVLM), núcleo ambíguo (NA) e núcleo dorsal motor do vago (DMV) estão diretamente envolvidos no controle neural dos reflexos cardiovasculares, dentre eles o barorreflexo, quimiorreflexo e reflexo cardiopulmonar (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

No hipotálamo, o PVN é um núcleo que contém populações de neurônios magnocelulares e parvocelulares, sendo que os magnocelulares são responsáveis pela secreção de vasopressina e ocitocina na corrente sanguínea (BADOER, 2001) e os parvocelulares projetam-se para outras áreas, tais como o RVLM e coluna intermédia lateral (IML) sendo estas envolvidas no controle de funções autonômicas

(SWANSON; SAWCHENCKO, 1980; BADOER, 2001). O PVN também recebe projeções intra-hipotalâmicas de áreas como o núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH), envolvido em respostas ao estresse, e do núcleo arqueado (ARC), cujas funções relacionam-se com o controle alimentar e o balanço energético (BARSH; SCHWARTZ, 2002). Além do PVN, existem evidências de que o DMH, uma área hipotalâmica conhecida como de defesa, tenha seu papel nas funções cardiovasculares, por mediar respostas neuroendócrinas ao estresse (DIMICCO *et al.*, 2002; HORIUCHI *et al.*, 2006).

A ideia de um controle neural da ingestão alimentar também não é nova: em 1953, KENNEDY propôs que componentes do tecido adiposo seriam capazes de agir no hipotálamo, sinalizando a situação das reservas energéticas. Nesse mesmo sentido, por muito tempo vigorou um dos mais famosos modelos de controle do comportamento alimentar, baseado em dois grandes centros hipotalâmicos, sendo o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) o “centro da saciedade” e a área hipotalâmica lateral (LHA) o “centro da fome (STELLAR, citado por ELMQUIST *et al.*, 1999). Porém, com o refinamento das técnicas experimentais, viu-se que a circuitaria envolvida nesse controle seria muito mais complexa, como revisto por ELMQUIST *et al.* (1999). Além disso, a descoberta da leptina em 1994 por ZHANG *et al.* abriu caminho para aprimorar ainda mais esses conceitos.

No contexto atual, o ARC aparece como uma das regiões hipotalâmicas mais importantes. Seus neurônios são divididos em duas grandes populações: uma população orexígena que coexpressa o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP) e uma anorexígena, com coexpressão de proopiomelanocortina (POMC - um precursor do hormônio estimulador de α -melanócito, o α -MSH) e o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) (BARSH; SCHWARTZ, 2002). Hormônios como leptina, insulina e peptídeo YY são indicadores de “saciedade” e inibem os neurônios NPY/AgRP, ao passo que a grelina, hormônio secretado no estômago e relacionado à duração das refeições, ativa-os (MORTON, 2006). Por outro lado, quando os níveis de leptina estão altos, os neurônios POMC/CART são estimulados (SCHWARTZ, 2006).

Identificado por DOUGLASS *et al.* em 1995, o CART é um peptídeo amplamente distribuído em áreas do sistema nervoso importantes no controle alimentar, dentre elas ARC e LHA e também no PVN e no DMH (COUCEYRO *et al.*,

1997). Está presente também no trato gastrointestinal (EKBLAD, 2005), medula adrenal, adeno-hipófise (COUCEYRO et al, 1997) e no pâncreas (WIERUP; SUNDLER, 2006). As ações desse peptídeo são igualmente amplas, estendendo-se desde o comportamento alimentar até efeitos locomotores, funções endócrinas e respostas ao estresse (ROGGE et al., 2008). Estudos já demonstraram que há significativa expressão de CART em áreas do SNC envolvidas na função cardiovascular, tais como a região C1 (DUN et al., 2002) do bulbo e em projeções para a coluna intermédio-lateral (ELIAS et al, 1998). São conhecidas duas formas ativas de CART, os fragmentos 55–102 (mais abundante) e 62–102 (ROGGE et al., 2008; LAU e HERZOG; 2014), contudo, até hoje não foi identificado um receptor específico para esse peptídeo (LAU e HERZOG; 2014), o que representa uma importante limitação técnica para os estudos com CART.

Apesar dessa limitação, alguns estudos sobre a ação do CART no SNC merecem destaque: MATSUMURA et al. (2001) observaram um aumento significativo na pressão arterial, frequência cardíaca e atividade do nervo simpático renal de coelhos não anestesiados, após uma injeção intracerebroventricular de CART. Outro estudo conduzido em ratos anestesiados evidenciou que o CART foi capaz de potencializar os efeitos promovidos pelo glutamato ao nível de medula espinhal (SCRUGGS et al., 2005).

Em 2004, HWANG et al., mostraram que o CART administrado via cisterna magna em ratos anestesiados causou um aumento na pressão arterial e frequência cardíaca de forma dose-dependente, além de induzir a expressão de FOS em neurônios da região C1, ou seja, o CART foi capaz de ativar esses neurônios. Além da expressão de FOS na região C1, outros estudos mostram que a administração de CART no SNC de ratos induz FOS nos núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle do comportamento alimentar (VRANG et al., 1999, 2000; SMEDH et al. 2015). Porém, nenhum desses trabalhos envolvia abordagem em animais obesos, o que seria uma interessante, visto que a obesidade é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial (OMS, 2017).

Nesse sentido, um trabalho recente (CHAAR et al., 2016), desenvolvido no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, mostrou que camundongos alimentados durante oito semanas a uma dieta hiperlipídica – com \approx 60% do valor energético total proveniente de lipídios – tornaram-se obesos, mas além

disso também desenvolveram hipertensão e apresentaram uma expressão de CART aumentada no hipotálamo, mais especificamente no DMH, e este aumento mostrou-se positivamente correlacionado com a hipertensão secundária à obesidade nestes animais.

1.2 JUSTIFICATIVA

Esses dados nos levam a sugerir que o CART atua de forma diferente no hipotálamo dos animais obesos, podendo, nesse caso, estar relacionado com a hipertensão secundária à obesidade. Por isso, torna-se relevante compreender os potenciais sítios hipotalâmicos de atuação desse neuropéptido, para melhor compreender os mecanismos que levam um paciente obeso a ter um maior risco de desenvolver hipertensão.

2 OBJETIVO

Avaliar a ação do CART em núcleos hipotalâmicos envolvidos diretamente com a circuitaria neuronal do sistema nervoso autônomo, e as possíveis diferenças entre a ação desse neuropeptídeo em animais eutróficos e obesos, buscando compreender a função do CART no desenvolvimento da hipertensão na obesidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Após a entrega, os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), com ciclo de 12h claro/12h escuro; temperatura de 21-22°C; água e comida *ad libitum* (exceto quando indicado). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP sob o número 88/2015.

3.2 DIETAS

Os camundongos foram recebidos com sete semanas de idade e então foram alocados no biotério do departamento por uma semana para aclimação. Durante essa semana, todos receberam uma dieta comum, composta por uma ração comercial para roedores de laboratório (Nuvilab® Produtos Agropecuários Ltda., Colombo, PR, Brasil). Terminado esse período, os camundongos – agora com oito semanas de idade – foram divididos aleatoriamente em dois grandes grupos. Um desses grupos foi o grupo eutrófico (controle), que continuou recebendo a dieta comum, e o outro o grupo obeso, que recebeu dieta hiperlipídica. Ambos receberam suas respectivas dietas durante oito semanas.

A dieta hiperlipídica em questão foi preparada a partir de receita adaptada anteriormente por CHAAR (2016), baseada na dieta de manutenção AIN-93M, desenvolvida especificamente para roedores de laboratório (REEVES *et al.*, 1993; REEVES 1997). O valor energético total (VET) em 100g da dieta comum é de 324 kcal

(MANIERO, 2009), enquanto que 100g de dieta hiperlipídica fornecem 527 kcal. A distribuição aproximada dos macronutrientes de cada dieta se dá conforme os dados da Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos macronutrientes das dietas comum e hiperlipídica.

Macronutriente	Comum		Hiperlipídica	
	(g/100g)	% do VET	(g/100g)	% do VET
Proteínas	22,21	27,4	25,84	19,6
Carboidratos	49,13	60,7	27,38	20,8
Lipídeos	4,29	11,9	34,89	59,6

Fonte: adaptado de MANIERO, 2009 (dieta comum) e CHAAR, 2016 (dieta hiperlipídica)

3.3 PARAMÊTROS ZOOMÉTRICOS

Tanto a evolução do peso corporal quanto o consumo alimentar dos camundongos foram acompanhados, semanalmente, durante as oito semanas. Como parâmetro para estimar a adiposidade de ambos os grupos, foram coletados e pesados os coxins de tecido adiposo branco subcutâneos, periepididimais, retroperitoniais e perirrenais. A soma desses quatro coxins foi considerada a adiposidade dos animais.

Por fim, os dados do peso corporal de cada animal foram corrigidos de acordo com o comprimento de sua tíbia (peso corporal em gramas ÷ comprimento da tíbia em milímetros).

3.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)

Entre a sétima e a oitava semana da dieta, os animais foram submetidos a um jejum de seis horas. Após esse período, uma amostra de sangue do epitélio caudal de cada camundongo foi coletada para aferir sua glicemia basal (tempo 0). Após essa medida, os animais receberam uma sobrecarga de glicose (1g/kg de peso corporal)

por meio de uma injeção intraperitoneal. A glicemia foi aferida novamente aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção. Os níveis de glicemia foram determinados através de um glicosímetro de uso comercial (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

3.5 IMPLANTE DE CÂNULA-GUIA INTRACEREBROVENTRICULAR (I.C.V.)

Para o implante de cânula-guia no ventrículo cerebral lateral (VL) os camundongos foram anestesiados com anestésico volátil isoflurano ou halotano (5% no ar inspirado de oxigênio medicinal) e a completa anestesia foi confirmada pela ausência do reflexo de dor com pinçamento da pata ou reflexo de piscar para que os animais pudessem ser colocados no esterotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA). Os animais então tiveram a região dorsal da cabeça depilada e depois a cabeça colocada em posição plana e fixada por meio das barras auriculares do aparelho estereotáxico.

Foi injetado (via subcutânea) um anestésico local com vasoconstritor (cloridrato de lidocaína, 3%, com bitartarato de norepinefrina 1:50.000), na região do escalpo que foi aberta, a fim de se evitar sangramentos após a incisão cirúrgica. Logo após a assepsia da pele com solução de álcool iodado (1%) uma incisão longitudinal foi feita com bisturi na pele e tecido subcutâneo, expondo-se a região da calota craniana, que logo em seguida foi tratada com solução fisiológica estéril e água oxigenada para a completa assepsia da área e melhor visualização do bregma. Com a torre na posição de angulação zero, foram feitas as leituras das seguintes coordenadas a partir do bregma: -0,4 mm anteroposterior, +1,0 mm lateral e -1,9 mm dorsoventral (FRANKLIN e PAXINOS, 2007).

Uma vez determinado o ponto de introdução da cânula-guia, o próximo passo foi a trepanação da calota craniana com auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício foi introduzida, em direção ao VL, a cânula-guia de 10 mm confeccionada a partir de uma agulha de seringa (26 G). Após a introdução da cânula-guia, a mesma foi fixada ao crânio com resina acrílica de uso odontológico (Simplex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e ancorada por pequenos parafusos de aço-inoxidável previamente introduzidos na calota craniana.

Após fixação com acrílico, a cânula-guia foi ocluída por um mandril (retirado no dia da microinjeção) para evitar contaminação e/ou obstrução por resíduos. Como medida profilática cada animal recebeu uma injeção de antibiótico e analgésico (Pentabiótico veterinário e Biofen 1% ambos no volume de 0,1mL, via subcutânea). Os animais tiveram um período de recuperação de três dias.

3.6 MICROINJEÇÃO DE CART

O CART (CART 55–102, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA) foi dissolvido em solução salina estéril, conforme instruções do fabricante. As microinjeções foram realizadas por meio de uma seringa Hamilton de 1 μ L (Hamilton, Reno, NV) conectada por um tubo Tygon® (0,254 mm de diâmetro interno e externo) a uma microinjetora 1 mm mais longa do que a cânula-guia. O volume injetado foi sempre de 1 μ L.

3.7 PERFUSÃO TRANSCARDÍACA

Para a fixação do tecido cerebral após a administração do CART, os animais foram primeiramente anestesiados com o anestésico veterinário ketamina (Dopalen, Ceva Saúde Animal) e então submetidos à abertura da caixa torácica para a exposição do coração. Um cateter conectado a uma bomba peristáltica (Gilson's MINIPULS® 3) foi inserido no ventrículo cardíaco esquerdo e uma pequena incisão foi feita no átrio direito. O animal foi primeiramente perfundido com solução salina estéril e em seguida com paraformaldeído 4% (PFA).

3.8 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os encéfalos coletados foram mantidos em uma solução de 20% de sacarose em paraformaldeído. Cada encéfalo foi seccionado em cortes coronais por meio de um micrótomo (Leica Microsystems, modelo SM 2010R, Nussloch, Alemanha) na espessura de 40µm e armazenados a -20°C em solução anti-freezing. Os cortes selecionados passaram então pelas seguintes etapas:

Dia 1:

- Três lavagens de 10 minutos cada em tampão fosfato de potássio (KPBS) 0,02M;
- Tratamento durante 15 minutos com peróxido de hidrogênio a 0,3% em tampão KPBS 0,02M com Triton X-100 a 0,3% (KPBS-Triton);
- Quatro lavagens de 10 minutos em KPBS 0,02M;
- Incubação por 48 horas em um anticorpo primário de coelho anti-FOS (PC-38, Calbiochem®) na diluição de 1:20000 com soro normal de burro (Jackson Immunoresearch Laboratories, USA) a 2% em KPBS-Triton;

Dia 2:

- Três lavagens de 10 minutos cada em KPBS 0,02M;
- Incubação por 90 minutos em um anticorpo secundário biotilado de burro anti-IgG de coelho (Jackson Immunoresearch Laboratories, USA) na diluição de 1:1000 em KPBS-Triton.
- Três lavagens de 10 minutos cada em tampão KPBS 0,02M;
- Incubação por 90 minutos no complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain Elite ABC HRP Kit, Vector Laboratories)
- Três lavagens de 10 minutos cada em tampão KPBS 0,02M;

- Incubação por 10 minutos em uma solução contendo o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB), cloreto de amônia e a enzima glicose oxidase e tampão fostato de sódio (NaPBS) 0,1M;
- Adição de 200µL de β-D-glicose a 10% para iniciar a reação da peroxidase.

Após os cortes atingirem a coloração desejada, a reação foi interrompida por sucessivas lavagens com tampão KPBS 0,02M. Após o término da reação, os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas e, no dia seguinte, desidratados em concentrações crescentes de álcool e xilol, conforme a seguinte bateria:

- Álcool 50% - 1 minutos;
- Álcool 70% - 1 minutos;
- Álcool 95% I - 1 minutos;
- Álcool 95% II - 1 minutos;
- Álcool 100% I - 1 minutos;
- Álcool 100% II - 1 minutos;
- Xilol - 1 minutos.

Após a desidratação, as lâminas foram cobertas com D.P.X. (Sigma-Aldrich®) e lamínula.

3.9 QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS À FOS

As áreas do hipotálamo que expressaram a marcação marrom após a exposição ao DAB foram identificadas e delimitadas com base no atlas "*The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates*" (FRANKLIN e PAXINOS, 2007). A quantificação dos neurônios foi realizada usando imagens das regiões de interesse capturadas em um microscópio óptico. Tal quantificação foi feita por contagem manual com auxílio do software gratuito ImageJ (v1.50i, National Institutes of Health, USA).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da análise estatística estão apresentados como média±erro padrão da média, e todos os cálculos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

Os dados referentes ao peso inicial dos animais, ganho de peso dos grupos e da área sob a curva referente ao ipGTT foram analisados pelo teste t de Student não-pareado bicaudal. As análises evolução do peso corporal, do consumo alimentar, da adiposidade, e da curva glicêmica (referente ao GTT) foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Para as comparações da imunorreatividade à FOS (FOS-ir) nos diferentes tratamentos foi usada ANOVA de duas vias, com pós-teste de Dunnett, usando como controle o grupo eutrófico-veículo. O nível de significância adotado em todas as análises foi de 5% ($p < 0,05$).

4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS ATIVADOS PELA AÇÃO CENTRAL DO CART EM ANIMAIS EUTRÓFICOS E OBESOS

Os camundongos foram divididos em dois grupos, de acordo com a dieta que receberam (comum ou HL) durante oito semanas. Após esse período, esses animais receberam um implante de cânula-guia intracerebroventricular, para a microinjeção de 1µL de CART 55-102 nas concentrações de 400µM, 1mM ou veículo. As concentrações utilizadas foram baseadas em estudos anteriores DE MATSUMURA et al. (2001) e HWANG et al. (2004).

Para identificar quais núcleos hipotalâmicos poderiam ser ativados pelo CART, foi escolhido o gene de ativação imediata c-FOS como marcador para atividade neuronal (CHAUDHURI, 1997; PRADO e DEL BEL, 1998).

Os animais foram acomodados em gaiolas individuais e colocados na sala onde foi realizado o experimento 48 horas antes, para uma melhor aclimação. Além disso, durante esse período, esses animais foram gentilmente manipulados, simulando os procedimentos da microinjeção do experimento. Essa foi uma forma de “acostumar” os animais e tentar minimizar a interferência que pode ocorrer na expressão de FOS por conta do estresse da manipulação que os animais geralmente sofrem.

Os encéfalos dos animais foram coletados 90 minutos após a microinjeção e posteriormente analisados por imunohistoquímica para avaliar a ativação neuronal por meio da expressão da proteína FOS. Foram analisados cortes de -0,34 mm a -2,80 mm em relação ao bregma (FRANKLIN e PAXINOS, 2007)

Para a análise, os subgrupos foram formados conforme a microinjeção que os animais receberam, conforme listado abaixo:

- Eutrófico – Veículo;
- Eutrófico – CART 400 μ M;
- Eutrófico – CART 1mM;
- Obeso – Veículo;
- Obeso – CART 400 μ M;
- Obeso – CART 1mM.

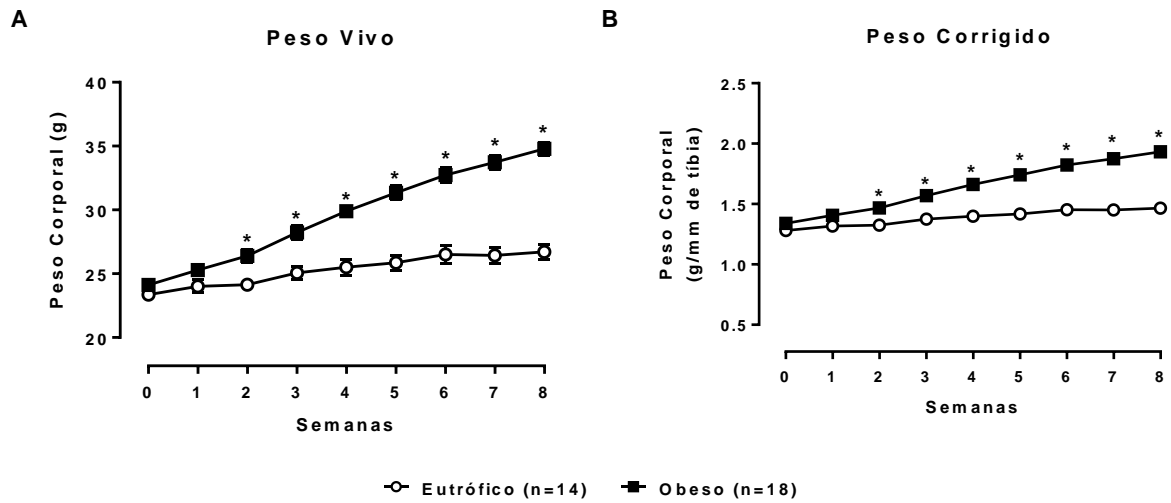
5 RESULTADOS

5.1 GANHO DE PESO E ADIPOSIDADE RESULTANTES DO CONSUMO DE DIETA HL

Após o período de aclimação, os animais foram divididos em dois grupos de forma aleatória e então as médias do peso corporal de cada grupo foram comparadas como uma forma de garantir que a evolução do peso corporal de ambos partisse de um ponto estatisticamente semelhante. A média do peso inicial do grupo obeso era de $24,11\text{g} \pm 0,369$, enquanto que a do grupo eutrófico era de $23,36\text{g} \pm 0,414$. Essas médias foram comparadas utilizando o teste t de Student não pareado, o que confirmou que não havia diferença significativa entre os grupos ($p=0,185$).

No decorrer das oito semanas foi possível observar que a evolução ponderal do grupo obeso era diferenciada do grupo eutrófico, apresentado um peso corporal maior já partir da segunda semana (obeso= $26,39\text{g} \pm 0,512$ vs. eutrófico= $24,14\text{g} \pm 0,417$; $p<0,05$; two-way ANOVA) como observado na figura 1 A. A média do ganho de peso total do grupo obeso foi de $10,56\text{g} \pm 0,612$, enquanto o ganho total do grupo eutrófico foi de apenas $3,214\text{g} \pm 0,422$ ($p<0,05$; teste t de Student; figura 2 A). Na figura 1 B está representado o gráfico da evolução do peso corporal desses animais, após a correção pelo tamanho de suas respectivas tíbias, e é possível observar que ainda assim observa-se uma diferença entre os grupos, reforçando que o maior ganho peso do grupo obeso foi devido ao acúmulo excessivo de tecido adiposo. Por fim, a análise dos coxins de gordura coletados desses animais confirmou que o grupo obeso possuía uma maior massa adiposa (Figuras 2 B).

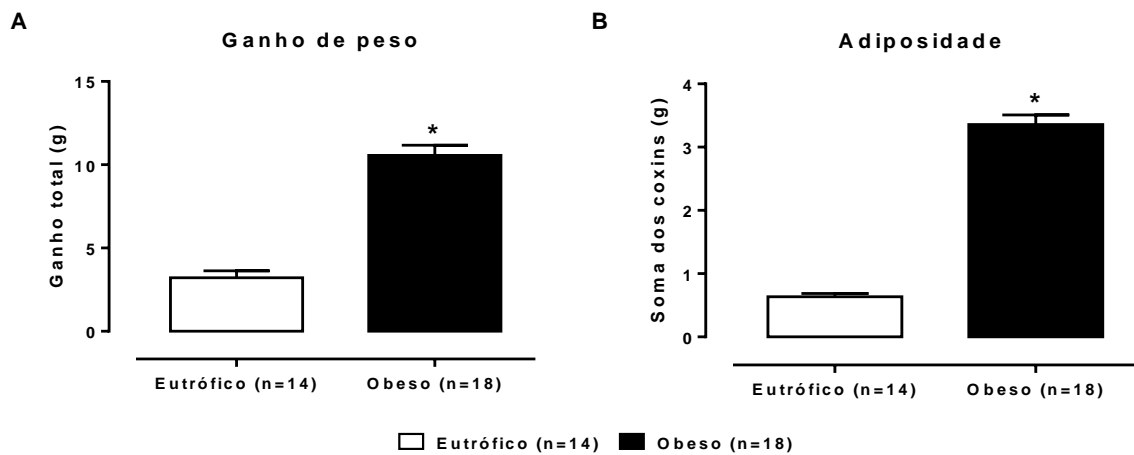
Figura 1 – Evolução semanal do peso corporal/peso vivo (A) e do peso corrigido pela tíbia (B)



Fonte: ROMEU, 2017

*p<0,05 em relação ao grupo eutrófico. ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni.

Figura 2 – Ganho de peso total (A), e adiposidade (B) dos animais eutróficos e obesos após oito semanas de dieta.



Fonte: ROMEU, 2017

*p<0,05 em relação ao grupo eutrófico. Teste t de Student.

5.2 CONSUMO DE RAÇÃO E CONSUMO ENERGÉTICO

Apesar de o grupo obeso apresentar maior ganho de peso e adiposidade, os dados do consumo semanal de ração mostraram que o grupo eutrófico consumiu uma quantidade de ração superior, consumindo uma média de 210,40g \pm 3,778, enquanto que os animais obesos consumiram em média 134,30g \pm 1,977 ($p < 0,05$; teste *t* de Student). Essa diferença na quantidade absoluta de ração consumida refletiu-se no consumo energético dos animais, sendo que o grupo obeso consumiu um total de 707,90kcal \pm 10,310 e o grupo eutrófico consumiu um total de 681,60kcal \pm 10,4200, não havendo diferença estatística entre os grupos nesse caso ($p = 0,05$; teste *t* de Student). Os dados do consumo estão sumarizados na tabela 2

Tabela 2 – Consumo de ração e consumo energético dos animais eutróficos e obesos ao fim de oito semanas de dieta.

Consumo total	Eutrófico (n=14)	Obeso (n=18)
Ração (g)	210,40	134,30*
Energia (kcal)	681,60	707,90

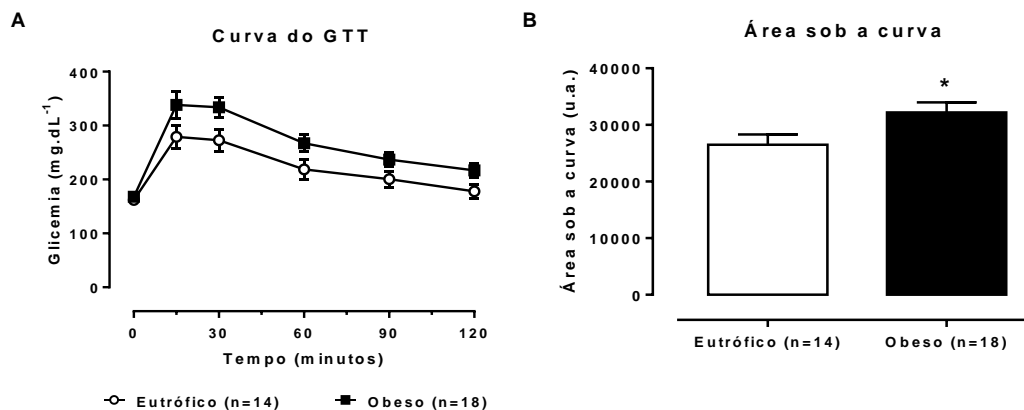
Fonte: ROMEU, 2017

* $p < 0,05$ em relação ao grupo eutrófico. Teste *t* de Student não pareado.

5.3 EFEITOS DA DIETA HL NA HOMEOSTASE GLICÊMICA

Mesmo com o maior ganho de peso e maior acúmulo de tecido adiposo, os animais obesos apresentaram uma glicemia basal semelhante aos eutróficos, embora o grupo obeso tenha se mostrado menos tolerante à glicose após receberem uma dose de 1g/kg de glicose por via intraperitoneal, fato que fica evidenciado pela sua curva glicêmica com uma área maior do que a curva do grupo eutrófico (figuras 3 A e B).

Figura 3 – Curva glicêmica referente ao GTT (A) e área sob a curva (B) dos animais eutróficos e obesos.



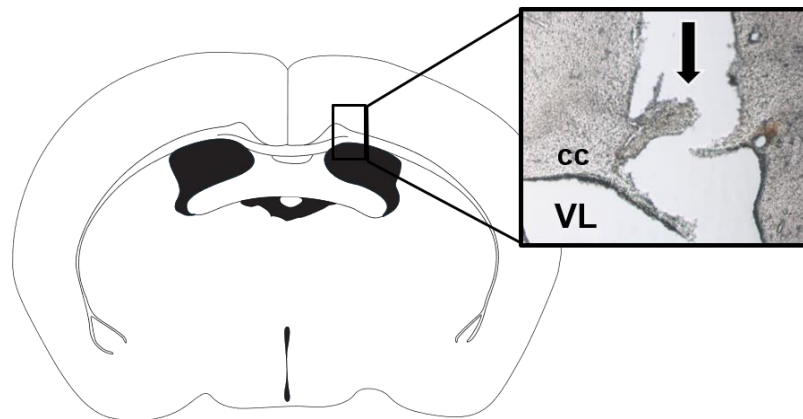
Fonte: ROMEU, 2017

* $p < 0,05$ em relação ao grupo eutrófico. Teste *t* de Student. U.a.: unidades arbitrárias.

5.4 ATIVAÇÃO DE NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS PELA AÇÃO CENTRAL DO CART

Para avaliar a ação central do CART no hipotálamo, foram analisados cortes em um nível (em relação ao bregma) representativo para os núcleos que expressaram a marcação de FOS. Foram considerados neurônios FOS-positivos aqueles que expressaram uma marcação nuclear de tom marrom-escuro, produto da reação com DAB. Foi observada uma imunorreatividade à FOS (FOS-ir) nos núcleos paraventricular (PVN), dorsomedial (DMH), arqueado (ARC) e ventromedial (VMH) do hipotálamo. Encéfalos cujo sítio de microinjeção estava deslocado, ou que o tecido não apresentava boa qualidade para a imunohistoquímica (por exemplo, danificados na região do hipotálamo) foram descartados da análise. Um exemplo de um corte com a trajetória em direção ao VL está representado na fotomicrografia da figura 4.

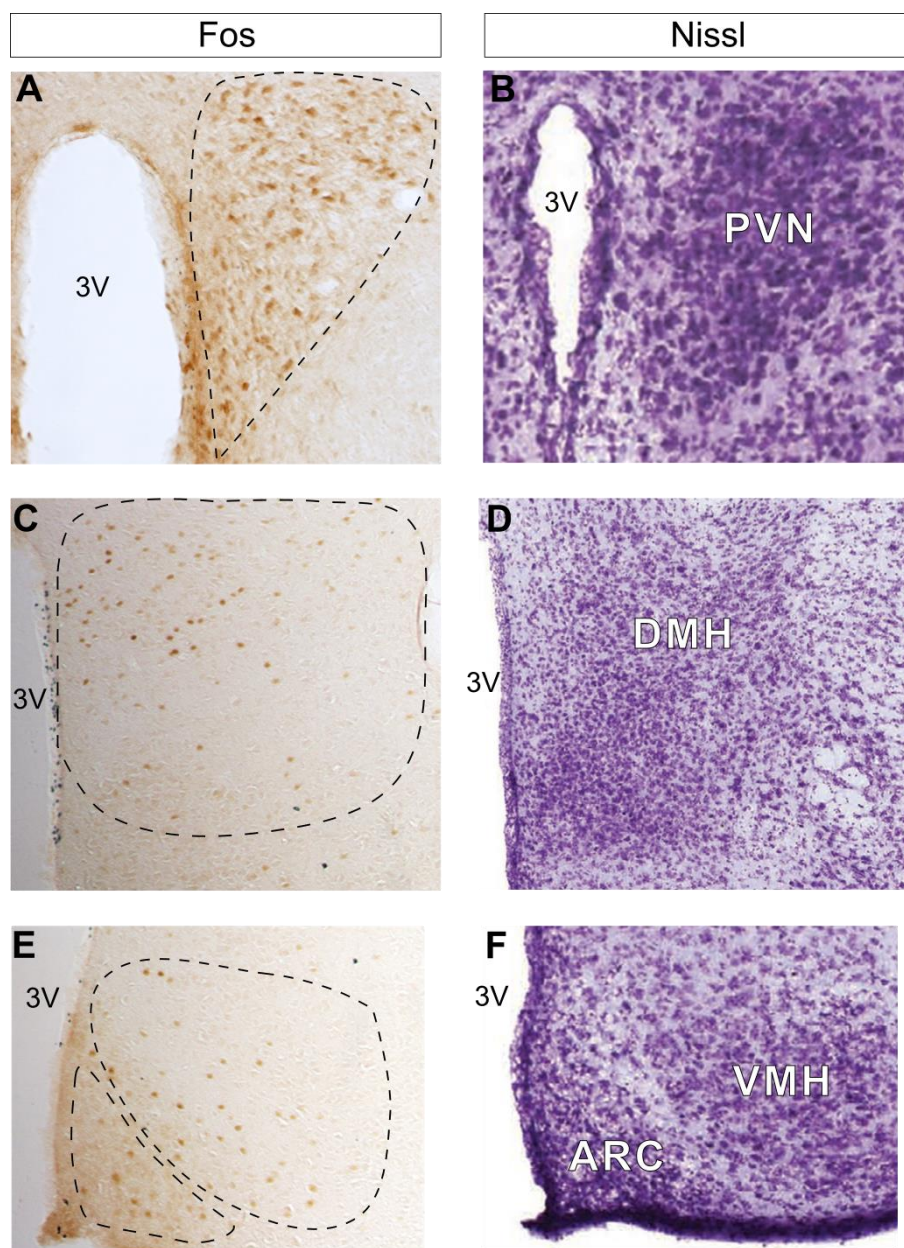
Figura 4 – Fotomicrografia representativa de um sítio positivo de microinjeção em direção ao ventrículo lateral.



Fonte: ROMEU, 2017; adaptado de FRANKLIN e PAXINOS, 2007
VL: ventrículo lateral; cc: corpo caloso.

As fotomicrografias das áreas que apresentaram FOS-ir estão representadas na figura 5 e estão comparadas com a referência. A FOS-ir mais intensa foi observada no PVN e DMH dos camundongos do grupo Obeso que receberam CART a 1mM, como quantificado nos gráficos da figura 6. Não houve diferença estatística entre os grupos para ARC e VMH

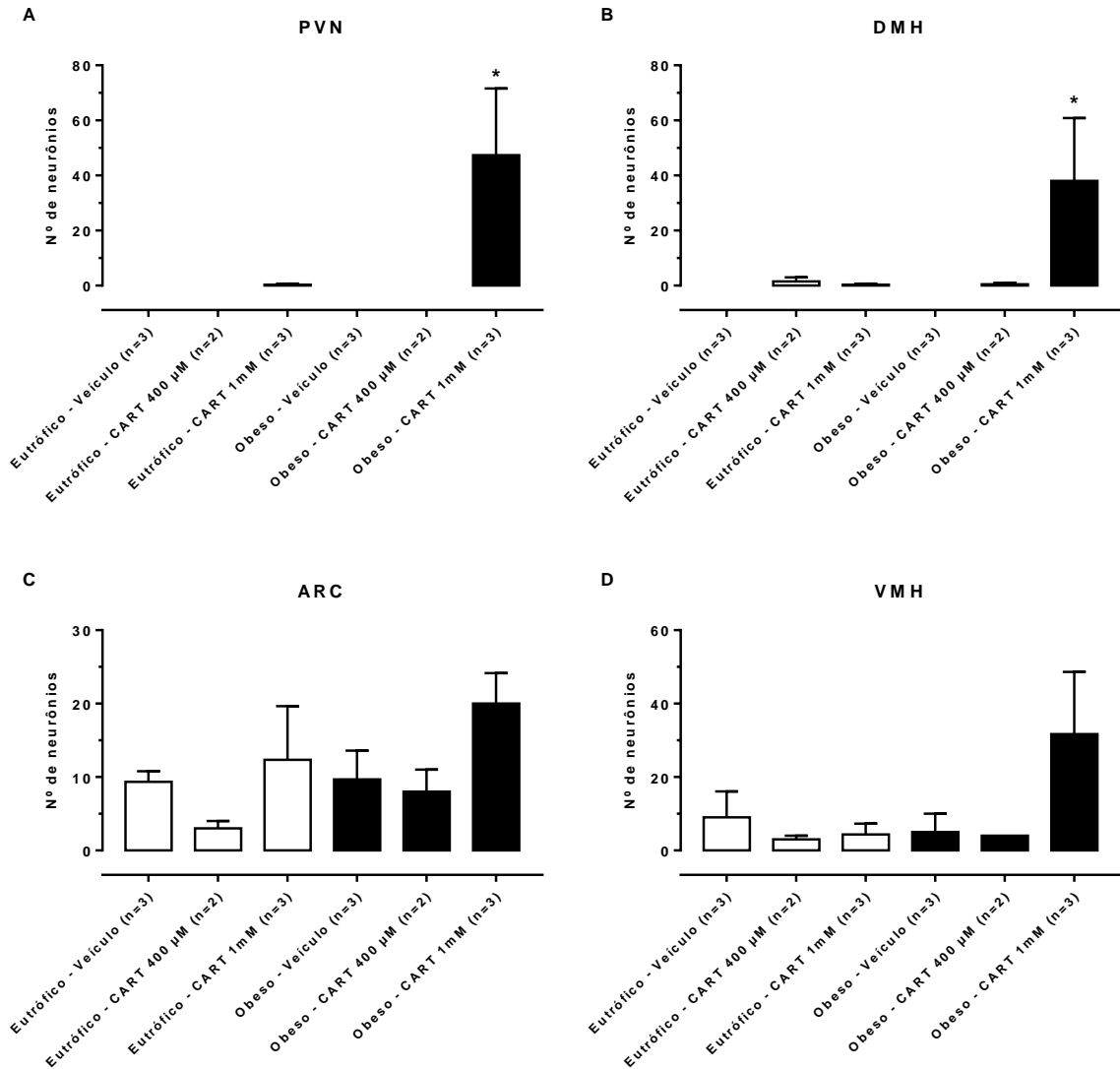
Figura 5 – Fotomicrografias representativas da FOS-ir observada no hipotálamo dos animais obesos que receberam CART 1mM (A, C e E) comparadas com suas respectivas referências anatômicas (B, D e F, coradas por método de Nissl) do atlas de FRANKLIN e PAXINOS (2007).



Fonte: ROMEU, 2017; adaptado de FRANKLIN e PAXINOS, 2007

PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; DMH: núcleo dorsomedial do hipotálamo; ARC: núcleo arqueado do hipotálamo; VMH: núcleo ventromedial do hipotálamo; 3V: terceiro ventrículo.

Figura 6 – Quantificação dos neurônios FOS-positivos no hipotálamo de animais eutróficos e obesos, conforme a microinjeção que receberam.



Fonte: ROMEU, 2017

* $p < 0.05$ em relação ao subgrupo eutrófico – veículo. ANOVA de duas vias com pós-teste de Dunnett. PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; DMH: núcleo dorsomedial do hipotálamo; ARC: núcleo arqueado do hipotálamo; VMH: núcleo ventromedial do hipotálamo.

6 DISCUSSÃO

Estudos anteriores já mostraram que a administração central de CART pode levar a alterações nas variáveis cardiovasculares tanto de animais anestesiados quanto conscientes (MATSUMURA *et al.*, 2001; HWANG *et al.*, 2004 e SCRUGGS *et al.*, 2005). Propusemos estudar a ação central do CART também em animais obesos, avaliando os núcleos encefálicos ativados pela sua administração intracerebroventricular, e relacionar os resultados obtidos com controle cardiovascular.

Nossos resultados mostraram que o CART foi capaz de ativar de maneira mais intensa o PVN e o DMH, dois núcleos relevantes no que diz respeito à gênese da hipertensão. Sabe-se que o PVN não só recebe projeções vindas do DMH (SWANSON & KUYPERS, 1980), como também se projeta para áreas do tronco encefálico envolvidas no controle do sistema nervoso simpático, como o bulbo rostroventrolateral (RVLM) e também para a coluna intermediolateral (IML) (SWANSON & SAWCHENCKO, 1980). Além disso, é importante notar que já foi demonstrado que, na obesidade induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica, neurônios que coexpressam CART e neuropeptídeo Y (NPY) projetam-se do DMH para o PVN (LEE *et al.*, 2013).

Quanto à importância do DMH nesse contexto, SIMONDS *et al.* demonstraram em 2014 que os níveis elevados de leptina em camundongos obesos levam ao aumento da pressão arterial, sendo que a leptina age em neurônios do DMH. Nesse mesmo estudo, a ablação dos receptores de leptina nesse núcleo resulta em uma queda da pressão arterial média dos animais, porém esses níveis retornam a valores elevados quando os receptores são restaurados (SIMONDS *et al.*, 2014). Porém, dados de um trabalho recente publicado por nosso grupo (CHAAR *et al.*, 2016), sugerem que os níveis elevados de leptina sozinhos não são a causa primária da hipertensão na obesidade, visto que parte dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, apesar de obesos e hiperleptinêmicos, não desenvolveram hipertensão (denominados no trabalho como *hypertension-resistant mice*). Por outro lado, o grupo

de animais obesos e hipertensos apresentou níveis elevados de RNAm de CART e de neurônios CART positivos no hipotálamo, precisamente no DMH.

Os resultados acerca da ativação desses núcleos hipotalâmicos em animais obesos, em conjunto com os estudos citados, apontam a importante função do CART agindo nessa circuitaria neuronal, muito provavelmente em ação sinérgica com a leptina e contribuindo para o desenvolvimento da hipertensão na obesidade. O ideal seria se houvesse um antagonista farmacológico para o CART para inibir estes neurônios no DMH, certificando sua real participação na hipertensão secundária à obesidade.

Os experimentos que envolvem a expressão da proteína FOS envolvem inúmeros fatores que podem influenciar os resultados finais, fatores esses que varia desde a dose/concentração do fármaco usado, local de microinjeção, modelo animal utilizado e, talvez o mais importante, o tempo após o estímulo no qual haverá o pico de expressão do gene c-fos e a tradução em proteína FOS no núcleo dos neurônios. Convencionalmente adota-se o tempo de 90 minutos (CHAUDHURI, 1997; PERRIN-TERRIN *et al.*, 2016), porém outros trabalhos que avaliaram a expressão de FOS após a administração de CART chegaram a visualizar a marcação de neurônios mesmo após 120 minutos (VRANG *et al.*, 1999 e 2000 e HWANG *et al.*, 2004). É importante reforçar que os trabalhos citados diferem quanto à concentração, modelo animal e sítio de microinjeção, além de não abordarem animais obesos. Esses detalhes podem explicar as diferenças em relação aos resultados obtidos, pois talvez com a administração de CART a uma concentração mais baixa, ou esperando um tempo maior para a tradução da proteína FOS, poderíamos ter observado marcação também em neurônios de outras regiões além do PVN, DMH, ARC e VMH.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que a ação central do CART parece ser mais efetiva no hipotálamo de camundongos obesos, em especial em núcleos autonômicos relacionados ao controle cardiovascular. Tais resultados são um indicativo de que o CART deve desempenhar uma função fundamental no desenvolvimento da hipertensão na obesidade, podendo atuar no hipotálamo em conjunto com outros componentes como a leptina. Mesmo na falta de um antagonista farmacológico, estudos futuros podem aprofundar esses resultados, como por exemplo identificar o fenótipo dos neurônios ativados pelo CART, com técnicas de dupla marcação na imunohistoquímica, e assim melhor compreender os mecanismos pelos quais o CART age no hipotálamo dos animais obesos.

8 IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA NO CAMPO DE ATUAÇÃO

O presente trabalho trata de uma pesquisa puramente experimental, visto que na sua proposta inicial a área de atuação escolhida foi a área de “docência”, na qual o nutricionista pode desenvolver pesquisas na área de alimentação e nutrição.

A metodologia aqui utilizada envolve técnicas e modelos experimentais (como é o caso da obesidade induzida por dieta hiperlipídica) amplamente utilizados nas pesquisas da área da saúde, fornecendo a base para uma possível atuação na área acadêmica. O envolvimento do nutricionista com esse tipo de pesquisa possibilita compreender melhor os mecanismos fisiológicos envolvidos nas doenças que podem ser causadas por uma má nutrição, bem como compreender como agem as terapias, farmacológicas ou não, a que seus futuros pacientes poderão estar submetidos.

REFERÊNCIAS¹

Barsh GS, Schwartz, MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature Reviews Genetics*. 2002;3(8):589-600.

Badoer E. Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society Symposium: The Hypothalamus. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28(1-2):95-99.

Campagnole-Santos M, Siqueira Haibara, A. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2001;8(1):30-40.

Chaar LJ, Coelho A, Silva NM, Festuccia WL, Antunes VR. High-fat diet-induced hypertension and autonomic imbalance are associated with an upregulation of CART in the dorsomedial hypothalamus of mice. *Physiological Reports*. 2016;4(11):e12811.

Chaar LJ. Hipertensão arterial e disfunção autonômica induzidas por dieta hiperlipídica: papel do CART e de fatores inflamatórios em núcleos autonômicos do sistema nervoso central [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP; 2016.

Chaudhuri A. Neural activity mapping with inducible transcription factors. *Neuroreport*. 1997;8(13):iii-vii.

Couceyro PR, Koyleu EO, Kuhar MJ. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 1997;12(4):229-241.

DiMicco J. *et al*. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002 Mar;71(3):469-80

Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P. PCR Differential Display Identifies a Rat Brain mRNA That Is Transcriptionally Regulated by Cocaine and Amphetamine. *The Journal of Neuroscience*. 1995;15(3):2471-2481.

Dun SL, Ng YK, Brailoiu GC, Ling EA, Dun NJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide-immunoreactivity in adrenergic C1 neurons projecting to the intermediolateral cell column of the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2002;23(2):123-132.

Ekblad E. CART in the enteric nervous system. *Peptides*. 2006;27(8):2024-2030.

Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR et al. Leptin Activates Hypothalamic CART Neurons Projecting to the Spinal Cord. *Neuron*. 1998;21(6):1375-1385.

¹De acordo com o estilo Vancouver

Elmqvist JK, Elias CF, Saper CB. From Lesions to Leptin. *Neuron*. 1999;22(2):221-232.

Esler, M, Lambert E, Schlaich M. Point: Chronic activation of the sympathetic nervous system is the dominant contributor to systemic hypertension. *J Appl Physiol*. 2001;109(6):1996-8.

Franklin KBJ, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 3. ed. San Diego: Elsevier, Academic Press; 2007.

Grassi G. *et al*. Participation of the Hypothalamus-Hypophysis Axis in the Sympathetic Activation of Human Obesity. *Hypertension*. 2001;38(6):1316-1320.

Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F. The 'neuroadrenergic hypothesis' in hypertension: current evidence. *Experimental Physiology*. 2010;95(5):581-586.

Guyton AC. Dominant role of the kidneys and accessory role of whole-body autoregulation in the pathogenesis of hypertension. *Am J Hypertens*. 1989;7(2):575-85.

Guyton AC. *et al*. Arterial pressure regulation. *The American Journal of Medicine*. 1972;52(5):584-594.

Hill J. Environmental Contributions to the Obesity Epidemic. *Science*. 1998;280(5368):1371-1374.

Horiuchi J, McDowall L, Dampney R. Differential Control of Cardiac and Sympathetic Vasomotor Activity from the Dorsomedial Hypothalamus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(12):1265-1268.

Hwang LL, Chen CT, Li TL, Chiu CZ, Chi SF. Central pressor effects of CART peptides in anesthetized rats. *Neuropeptides*. 2004;38(2-3):69-76.

Jones, D. Body weight and blood pressure Effects of weight reduction on hypertension. *American Journal of Hypertension*. 1996 ;9(8):50-S54.

Kennedy GC. The Role of Depot Fat in the Hypothalamic Control of Food Intake in the Rat. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1953;140(901):578-592.

Lau J, Herzog H. CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. *Frontiers in Neuroscience*. 2014;8.

Lee SJ, et al. Leptin stimulates neuropeptide Y and cocaine amphetamine-regulated transcript coexpressing neuronal activity in the dorsomedial hypothalamus in diet-induced obese mice. *Journal of Neuroscience*. 2013;33:15306–15317.

Lim S, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2012;380(9859):2224-2260.

Montani JP, *et al.* Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. *International Journal of Obesity*. 2002;26(2):S28-38.

Morton, GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006;443(7109):289-295.

Maniero F. Efeito em hamsters da suplementação dietética com gorduras ricas em ácidos graxos saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados sobre a transferência de lípidos para a lipoproteína de alta densidade (HDL) [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 2009.

Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I. Central Human Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript Peptide 55-102 Increases Arterial Pressure in Conscious Rabbits. *Hypertension*. 2001;38(5):1096-1100.

Navar LG. Counterpoint: Activation of the intrarenal renin-angiotensin system is the dominant contributor to systemic hypertension. *J Appl Physiol*. 2010;109(6):1998-2000.

Organização Mundial da Saúde. A Global Brief on Hypertension: Silent Killer, Global Public Health Crisis. WHO/DCO/WHD/2013. 2ª ed. Genebra, Suíça: Organização Mundial da Saúde; 2013.

Organização Mundial da Saúde [internet]. Obesity and overweight. [acesso em 24 mai 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>

Organização Mundial da Saúde. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. Genebra, Suíça: Organização Mundial da Saúde, 1998.

Perrin-Terrin A et al. The c-FOS Protein Immunohistological Detection: A Useful Tool As a Marker of Central Pathways Involved in Specific Physiological Responses In Vivo and Ex Vivo. *Journal of Visualized Experiments*. 2016;10.

Prado PTC, Del Bel E. A. C-fos, um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção. *Medicina (Ribeirao Preto)*. 1998;31(3):424-433.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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. *The Journal of Nutrition*. 1993;123(11):1939-51.

Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *The Journal of Nutrition*. 1997;127(5):838S-841S.

Rogge G, Jones D, Hubert GW, Lin Y, Kuhar MJ. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nature Reviews Neuroscience*. 2008;9(10):747-75

Scherrer U, et al. Body fat and sympathetic nerve activity in healthy subjects. *Circulation*. 1994;89(6):2634-2640.

Schwartz MW. Central Nervous System Regulation of Food Intake. *Obesity*. 2006;14(2S):1S-8S.

Scruggs P, Lai CC, Scruggs JE, Dun NJ. Cocaine – and amphetamine-regulated transcript peptide potentiates spinal glutamatergic sympathoexcitation in anesthetized rats. *Regulatory Peptides*. 2005;127(1-3):79-8

Simonds SE, et al. Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity. *Cell*. 2014;159:1404–1416.

Smedh U, Scott KA, Moran TH. Fourth ventricular CART peptide induces c-fos in the area postrema and nucleus of the solitary tract via a CRF-receptor dependent mechanism. 2015.

Sowers J, *et al.* Blood pressure and hormone changes associated with weight reduction in the obese. *Hypertension*, v. 4, n. 5, p. 686-691, 1982.

Swanson LW, Kuypers HG. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *The Journal of Comparative Neurology*. 1980;194(3):555-70.

Swanson LW, Sawchenko, PE. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology*, 1980;31(6):410-417.

Swinburn B, *et al.* The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*. 2011;378(9793):804-814.

Vigitel Brasil, 2013. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

Vrang N, Larsen PJ, Kristensen P, Tang-Christensen M. Central Administration of Cocaine-Amphetamine-Regulated Transcript Activates Hypothalamic Neuroendocrine Neurons in the Rat. *Endocrinology*. 2000;141(2):794-801.

Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen PJ, Kristensen P. Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Research*. 1999;818(2):499-509.

Wierup N, Sundler F. CART is a novel islet regulatory peptide. *Peptides*. 2006;27(8):2031-2036.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-432



AUTORIZAÇÃO PARA INSERÇÃO NA BIBLIOTECA DIGITAL DE TRABALHOS ACADÊMICOS - BTDA

Título do TCC: AÇÃO CENTRAL DO CAET NO HIPOTALAMO DE CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA: UM ESTUDO NEUROANATÔMICO.

Na qualidade de titular(es) dos direitos morais e patrimoniais de autor(es) que recaem sobre o meu(nosso) Trabalho de Conclusão de Curso, com fundamento nas disposições da Lei nº. 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, **autorizo(amos)** a Biblioteca da Faculdade de Saúde Pública da USP a publicar, em ambiente digital institucional, sem ressarcimento dos direitos autorais, o texto integral da obra acima citada, em formato PDF, a título de divulgação da produção acadêmica de graduação, gerada por esta Faculdade.

São Paulo, 07 / 12 / 2017

DEBORAH DE PAULA ROMEU
Autor 1

Nº USP: 8580402
e-mail: deborah.romeu@gmail.com
celular/fone: (11) 92578277

VAGNER ROBERTO ANTUNES
Autor 2

Nº USP: 3050263
e-mail: antunes@icb.usp.br
celular/fone: (11) 30917765
(11) 973352095

De acordo, _____

[Assinatura]
Orientador

Tramitação na FSP/USP

A COMISSÃO DE GRADUAÇÃO É SOBERANA PARA DECIDIR SOBRE OS CRITÉRIOS DE QUALIDADE PARA INCLUIR OU NÃO OS TRABALHOS NA BDTA.

A BIBLIOTECA É RESPONSÁVEL PELA INCLUSÃO DOS TRABALHOS RECEBIDOS DA COMISSÃO DE GRADUAÇÃO.

[Assinatura]

Prof. Dr. Ivan França Junior
Presidente da Comissão de Graduação

Recebido pela CG em: ____ / ____ / ____ por: _____

Liberado para submissão em: ____ / ____ / ____ por: _____

Biblioteca

Recebido em: ____ / ____ / ____ por: _____

Disponível na BDTA em: ____ / ____ / ____ por: _____

Obs: Preencher o Termo, assinar e enviar à Comissão de Graduação, juntamente com o arquivo eletrônico