

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**OBESIDADE PRECOCE INDUZ COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVOS E
ALTERA A EXPRESSÃO DE GFAP NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL**

DÉBORA CRISTINA DA CUNHA NONES

ALFENAS/MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**OBESIDADE PRECOCE INDUZ COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVOS E
ALTERA A EXPRESSÃO DE GFAP NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor(a) em Biociências Aplicadas à Saúde, pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociência e comportamento.

Orientadora: Fabiana Cardoso Vilela Giusti

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Nones, Débora Cristina da Cunha.

Obesidade precoce induz comportamentos tipo-depressivos e altera a expressão de GFAP no córtex pré-frontal / Débora Cristina da Cunha Nones. - Alfenas, MG, 2023.

73 f. : il. -

Orientador(a): Fabiana Cardoso Vilela Giusti.

Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Obesidade infantil. 2. Depressão. 3. GFAP. I. Giusti, Fabiana Cardoso Vilela, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

DÉBORA CRISTINA DA CUNHA NONES

OBESIDADE PRECOCE INDUZ COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVOS E ALTERA A EXPRESSÃO DE GFAP NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde

Aprovada em: 27 de outubro de 2023.

Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAI-MG

Profª. Drª. Bruna Kalil Cutti
Instituição: Universidade Federal de Rondonópolis
UFR-MT

Prof. Dr. Tayllon dos Anjos Garcia
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAI-MG

Profª. Drª. Ana Cláudia Alves Freire Ribeiro
Instituição: Centro Universitário UNA
UNA-MG

Prof. Dr. Bruno Zavan
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAI-MG



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Cardoso Vilela Giusti, Usuário Externo**, em 27/10/2023, às 11:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1125651** e o código CRC **90986AEC**.

Dedico a Deus, meus pais Ana Maria e José Carlos (*in memoriam*), meu esposo Luís Fernando, meus filhos Vitor Luís e João Fernando e à minha orientadora Fabiana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida e oportunidade de realizar mais um sonho.

Aos meus pais Ana Maria e José Carlos (*in memoriam*) por todos os valores transmitidos durante a vida. Por me mostrar a importância de buscar o que queremos. Em especial à minha mãe por toda ajuda durante esta fase, na qual em alguns momentos precisei estar longe e assumiu o papel de avó com ninguém.

Ao meu esposo Luís Fernando por me apoiar e ajudar para que este sonho se tornasse realidade. Pela paciência, compreensão e ajuda nos dias mais corridos.

Ao meu filho Vitor, por entender que a mamãe precisava ficar longe alguns dias para cuidar dos ratinhos e por ser minha inspiração para melhorar a cada dia.

Ao meu filho João Fernando, que participou, de dentro da barriga, de alguns experimentos e até da qualificação e aguentou firme e forte com a mamãe.

À minha orientadora professora Dra. Fabiana pela oportunidade de realizar esse projeto, pela paciência, ensinamentos e dedicação. Pelo carinho que sempre tem por todas suas filhas científicas.

Ao professor Dr. Alexandre, pela oportunidade dada ainda durante a graduação para a realização da iniciação científica, que despertou essa paixão pelos estudos, ciência e educação.

Às amigas do “LAB” que participaram diretamente da realização do trabalho, auxiliando durante a realização dos experimentos. Vocês foram essenciais.

À amiga Carol que me acolheu em sua casa em todos os dias de experimento com todo carinho e cuidado.

Às amigas “Desorientadas” por todo apoio, companheirismo, aprendizado durante as reuniões de “labmeeting”.

Aos técnicos do laboratório pela dedicação e por serem essenciais para a manutenção do ambiente.

A todos os membros do Programa de Pós Graduação em Biociências aplicadas à Saúde, em especial à Adriana, professor Valdemar e professor Maurício, pela disponibilidade sempre que precisei.

Aos animais, essenciais para a realização deste trabalho.

A todos os meus alunos por manterem acesa a luz desse amor por ensinar. É por eles a vontade de aprender cada vez mais e me manter nessa área tão amada.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pela disponibilidade e considerações importantes para o trabalho.

À UNIFAL, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“As conquistas dependem de 50% de inspiração, criatividade e sonhos, e 50% de disciplina, trabalho árduo e determinação. São duas pernas que devem caminhar juntas” (Augusto Cury)

RESUMO

A obesidade infantil e os transtornos mentais, incluindo a depressão, crescem de forma acelerada, trazendo inúmeras consequências ao indivíduo. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência da obesidade precoce induzida por redução de ninhada no desenvolvimento dos sintomas semelhantes aos de depressão além da expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Utilizou-se redução de ninhada, sendo ninhada reduzida (NR) com 4 filhotes (2 machos e 2 fêmeas) e ninhada normal (NN) contendo 12 filhotes (6 machos e 6 fêmeas). Foi avaliado o comportamento materno das progenitoras entre os dias pós-parto 2 e 5. Nos testes comportamentais com a prole foi realizado o teste de campo aberto, teste de comportamento social de brincar e teste de nado forçado. Foi realizada pesagem dos tecidos retroperitoneal, perigonadal e quantificação da expressão de GFAP do hipocampo e córtex pré-frontal por *Western Blotting*. O trabalho foi aprovado pela comissão de ética para uso de animais sob o número 036/2021. Os resultados foram avaliados através do *software GraphPad* versão 8.0. Comportamento materno foi avaliado pelo teste *t de student*. Para o peso utilizou-se 2-way RM ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, usando ninhada (NN e NR) e dias repetidos (1 a 36). Para os testes de comportamento, gorduras e western blotting utilizou-se ANOVA de duas vias seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls considerando os fatores de ninhada (NN ou NR) e sexo (macho ou fêmea) como fatores e para a correlação o teste de *Pearson*. A redução de ninhada aumentou o parâmetro maternal de lambar o filhote e diminuiu o parâmetro não maternal de ficar fora do ninho sem explorar. Houve ganho de peso mais acentuado nos animais de NR, tanto machos quanto fêmeas, a partir do PND25 que se manteve até o PND36. Observou-se maior peso da gordura retroperitoneal dos animais de NR, tanto nos machos quanto nas fêmeas e uma maior quantidade de gordura perigonadal nas fêmeas. Não houve alteração na atividade locomotora no teste de campo aberto. No teste de comportamento social de brincar houve redução no tempo de interação nos animais de NR, tanto nos machos quanto nas fêmeas. No teste de nado forçado os animais machos da NR apresentaram maior tempo de imobilidade. Observou-se ainda aumento da expressão da proteína GFAP no córtex pré-frontal dos animais machos de NR. Encontrou-se correlação entre o peso e tecido adiposo e a expressão de GFAP e entre a expressão de GFAP e tempo de imobilidade no nado forçado. Conclui-se que a redução de ninhada aumentou o comportamento materno e diminuiu os não maternais além de induzir o excesso de peso no período pré-púbere. Encontrando sintomas tipo depressivo acentuados em machos possivelmente por apresentarem uma astrogliose, caracterizada por maior expressão de GFAP no córtex pré-frontal.

Palavras-chave: Obesidade infantil; Depressão; GFAP.

ABSTRACT

Childhood obesity and mental disorders, including depression, are growing rapidly, bringing numerous consequences to the individual. The objective of the work was to evaluate the influence of early obesity induced by small litters on the development of depression-like symptoms in addition to the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP). Small litters were used, with a reduced litter (NR) containing 4 puppies (2 males and 2 females) and a normal litter (NN) containing 12 puppies (6 males and 6 females). The mothers' maternal behavior was evaluated between postpartum days 2 and 5. In behavioral tests with the offspring, the open field test, social play behavior test and forced swimming test were carried out. Weighing of the retroperitoneal and dangeronadal tissues and quantification of GFAP expression in the hippocampus and prefrontal cortex was performed by Western Blotting. The work was approved by the ethics committee for animal use under number 036/2021. The results were evaluated using GraphPad software version 8.0. Maternal behavior was assessed using the Student's t test. For weight, 2-way RM ANOVA was used followed by the Newman-Keuls test, using litter (NN and NR) and repeated days (1 to 36). For the behavior, fat and western blotting tests, two-way ANOVA was used followed by the Newman-Keuls multiple comparison test considering the litter factors (NN or NR) and sex (male or female) as factors and for the correlation the Pearson test. Small litter increased the maternal parameter of licking the chick and decreased the non-maternal parameter of staying outside the nest without exploring. There was a more pronounced weight gain in NR animals, both males and females, from PND25 onwards, which was maintained until PND36. A greater weight of retroperitoneal fat was observed in NR animals, both in males and females, and a greater amount of dangeronadal fat in females. There was no change in locomotor activity in the open field test. In the social play behavior test, there was a reduction in interaction time in NR animals, both in males and females. In the forced swimming test, male NR animals showed longer immobility time. An increase in GFAP protein expression was also observed in the prefrontal cortex of male NR animals. A correlation was found between weight and adipose tissue and GFAP expression and between GFAP expression and immobility time in forced swimming. It is concluded that litter reduction increased maternal behavior and decreased non-maternal behavior in addition to inducing excess weight in the pre-pubertal period. Finding marked depressive-like symptoms in males, possibly because they present astrogliosis, characterized by greater expression of GFAP in the prefrontal cortex.

Keywords: Childhood obesity; Depression; GFAP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Prevalência de excesso de peso e de obesidade na população adulta de 20 anos ou mais de idade, por sexo - Brasil - 2002-2003/2019.....	18
Figura 2 - Diferença do tamanho de animais fêmeas de ninhada normal e ninhada reduzida no PND8 e 15.....	22
Figura 3 - Imagem mostrando ninhada normal com doze filhotes e ninhada reduzida com 4 filhotes.....	23
Figura 4 - Diagrama representando a quantidade de animais nos protocolos de ninhada reduzida e a consequência no peso dos animais.....	24
Figura 5 - Efeito do tecido adiposo no desenvolvimento de inflamação sistêmica, neuroinflamação e alterações neuroquímicas e comportamentais.....	27
Figura 6 - Relação entre a ativação dos astrócitos e potencial impacto no comportamento.....	30
Figura 7 - Representação esquemática do delineamento experimental.....	35
Figura 8 - Delineamento experimental com a prole.....	36
Figura 9 - Representação esquemática de alguns parâmetros avaliados no comportamento materno.....	37
Figura 10 - Representação do aparato de campo aberto e sua análise pelo programa.....	38
Figura 11 - Representação do teste de comportamento social de brincar.....	39
Figura 12 - Representação do animal durante o teste de nado forçado.....	40
Figura 13 - Parâmetros maternos e não maternos das ratas lactantes de ninhada normal e ninhada reduzida	43
Figura 14 - Ganho de peso corporal dos filhotes de ninhada normal e ninhada reduzida entre os PND1 e PND36.....	44
Figura 15 - Peso dos animais de ninhada normal e ninhada reduzida no PND36.....	45

Figura 16 - Peso dos tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal dos animais de ninhada normal e ninhada reduzida.....	46
Figura 17 - Peso da glândula adrenal dos animais de ninhada normal e ninhada reduzida.....	47
Figura 18 - Parâmetros avaliados no teste de campo aberto realizado com os animais de ninhada normal e ninhada reduzida.....	48
Figura 19 - Tempo de interação no teste de comportamento social de brincar realizado com os animais de ninhada normal e ninhada reduzida.....	49
Figura 20 - Parâmetros avaliados no teste de nado forçado realizado com os animais de ninhada normal e ninhada reduzida.....	50
Figura 21 - Correlação entre o peso corporal do animal e a % de expressão de GFAP no córtex pré-frontal.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	OBESIDADE.....	17
2.2	OBESIDADE INFANTIL	18
2.3	DEPRESSÃO	20
2.4	MODELO DE OBESIDADE POR REDUÇÃO DE NINHADA....	22
2.5	RELAÇÃO ENTRE OBESIDADE E DEPRESSÃO	24
2.6	CÓRTEX	27
2.7	SISTEMA NERVOSO CENTRAL E ASTRÓCITOS.....	28
2.8	PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL (GFAP).....	30
3	JUSTIFICATIVA	32
4	OBJETIVOS	33
4.1	OBJETIVO GERAL	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5	MATERIAIS E MÉTODO	34
5.1	ANIMAIS	34
5.2	DELINEAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	34
5.3	GANHO DE PESO DAS NINHADAS E FILHOTES.....	36
5.4	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO	36
5.5	TESTE DO CAMPO ABERTO NOS FILHOTES	37
5.6	TESTE DE COMPORTAMENTO SOCIAL DE BRINCAR NOS FILHOTES	38
5.7	TESTE DO NADO FORÇADO NOS FILHOTES	39

5.8	PESAGEM DOS TECIDOS ADIPOSOS E DA GLÂNDULA ADRENAL DOS FILHOTES	40
5.9	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GFAP	40
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6	RESULTADOS	43
6.1	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO	43
6.2	AVALIAÇÃO DOS FILHOTES	43
6.2.1	<i>Ganho de peso dos filhotes</i>	43
6.2.2	<i>Pesagem de gordura epididimal e retroperitoneal dos animais</i>	45
6.2.4	<i>Testes comportamentais</i>	45
6.2.4.1	Campo aberto	46
6.2.4.2	Comportamento social de brincar	46
6.2.4.3	Nado forçado	47
6.2.5	<i>Western Blotting</i>	49
6.2.6	Correlação entre a porcentagem de expressão de GFAP no córtex pré-frontal com o peso corporal dos animais, peso de gordura retroperitoneal e tempo de imobilidade no teste de nado forçado.....	50
7	DISCUSSÃO	52
8	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO	73

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo excesso de gordura corporal. Apresenta origem multifatorial, podendo estar relacionada tanto a uma sobrecarga de ingestão alimentar quanto à diminuição do gasto calórico, gerando um total calórico positivo, podendo sofrer ainda influência de fatores genéticos, emocionais, socioeconômicos e ambientais (LEVIN, 2000; WADDEN *et al.*, 2002; BESSESEN, 2008; CABALLERO, 2019).

Segundo a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (2020), setecentos milhões de pessoas no mundo apresentam excesso de peso e no Brasil o aumento de casos de obesidade foi de 67,8% nos últimos 13 anos, sendo considerada a segunda maior causa de morte evitável do mundo.

A obesidade infantil também se apresenta crescente e torna-se de grande preocupação, o número de crianças e adolescentes obesos aumentou dez vezes nas últimas quatro décadas, fazendo com que a organização estimule os países a desenvolverem ações para a redução da obesidade precoce (VERDE, 2014). No Brasil, segundo a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (2020), há 12% das crianças e 7% dos adolescentes com obesidade.

A obesidade infanto juvenil pode, assim como no adulto, estar relacionada à diversas alterações fisiológicas e metabólicas em criança/adolescente, incluindo alterações ósseas, neurológicas, sanguíneas, pulmonares, esteatose hepática não alcoólica, aumento da resistência à insulina, elevação de glicemia e pressão arterial, maior risco de doenças cardíacas e câncer, além de poder apresentar essas patologias a longo prazo (PIETROBELLI, 2008; REINEHR; WABITSCH, 2011; CODONER-FRANCH *et al.*, 2014).

Em busca de maiores elucidações sobre essa doença crônica e suas consequências para o organismo, diversos estudos utilizando animais vêm simulando a relação entre a obesidade e consequentes mecanismos fisiológicos, neurológicos, endócrinos e patológicos, e para isso alguns protocolos são utilizados para o desenvolvimento da obesidade em roedores (GLUCKMAN *et al.*, 2007; PATE; SRINIVASAN, 2010).

Um protocolo bastante utilizado para o desenvolvimento de obesidade na prole de roedores é o de redução no tamanho da ninhada, que consiste em retirar parte da prole, diminuindo a competição e consequentemente aumentando a oferta de leite e

gordura para os que permaneceram, simulando dessa forma a supernutrição no período pós-natal (PATEL; SRINIVASAN, 2010; HABBOUT *et al.*, 2013; MOZES *et al.*, 2015; DEBARBA, 2017; ENES-MARQUES; GIUSTI PAIVA, 2018).

Além da obesidade, a depressão também é uma patologia preocupante e que vem aumentando nas últimas décadas. Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (2020) trezentas milhões de pessoas possuem depressão, a nível mundial. No Brasil a realidade não é diferente, sendo que uma estimativa feita demonstrou que mais de 10 mil pessoas maiores de 18 anos sofrem de depressão (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS, 2013).

Na infância, estudo de Souza e Rodrigues (2020) mostra um aumento de 4,5 para 8% de crianças com depressão no mundo, sendo que no Brasil, a estimativa é de que se tenha cerca de oito milhões de crianças com depressão. Nos EUA, as estimativas desses transtornos, considerando crianças e adolescentes que recebem cuidados médicos, variam entre 15% e 30%. Além disso, a depressão na adolescência continua frequente, sem que se observe diminuição, na idade adulta (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008).

Estudo utilizando animais buscam elucidar a fisiopatologia da depressão, sendo que já existem protocolos estabelecidos tanto para desenvolvimento quanto para observação de sintomas tipo depressivos em roedores. Um teste bastante utilizado para avaliar sintomas semelhantes aos de depressão em roedores é o teste de nado forçado, onde os animais são submetidos a uma situação considerada de perigo e seu comportamento é observado durante cinco minutos, observando se o mesmo se mantém em movimento, em busca de escapar da situação ou em imobilidade, com movimentos suficientes apenas para manter a vida (YANKELEVITCH-YAHAV *et al.*, 2015).

Pensando nessas duas patologias, há indicação de que a relação entre obesidade e depressão é considerada bidirecional e por isso, diversos estudos buscam elucidar se a obesidade leva a depressão ou se a depressão leva à obesidade (AMBRÓSIO *et al.*, 2018).

Trabalho realizado por Faith *et al.* (2011) avaliou 25 estudos que relacionaram a obesidade com a depressão e/ou depressão com obesidade, identificando que 80% dos estudos concluíram que a obesidade e/ou o aumento do índice de massa corporal

(IMC) são considerados motivadores de um desenvolvimento ou agravamento de quadros depressivos.

Metanálise realizada por Gibson-Smith *et al.* (2020) encontrou relação entre a obesidade aos oito anos de idade, ou seja, durante a infância, com risco aumentado para o desenvolvimento de depressão ao longo da vida.

Um estudo realizado na China mostra ainda que a prevalência de depressão e ansiedade é maior em crianças e adolescentes obesos do que crianças e adolescentes que não apresentam obesidade (WANG *et al.*, 2019).

Diversos fatores podem estar envolvidos com essa relação entre obesidade e depressão, entre eles, disfunção no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), disfunção no sistema serotoninérgico e dopaminérgico, efeito dos adipócitos no desenvolvimento de inflamação crônica, alterações na microbiota intestinal, entre outros, podendo alterar a homeostase de diversas funções neurológicas, entre elas as emoções e motivações, sendo que a inflamação parece ter um papel central no desencadeamento de todas as alterações observadas na relação obesidade e depressão (AMBRÓSIO *et al.*, 2018).

Almeida-Shurret *et al.* (2017) avaliaram estruturas do cérebro de ratos obesos encontrando aumento de IL-1 β no hipocampo e amígdala quando comparados a ratos não obesos, reforçando a hipótese de que a inflamação crônica sistêmica gerada pelo tecido adiposo é capaz de atingir o sistema nervoso central, interferindo na sinalização de astrócitos, principais células da glia, que são ativadas frente à algum tipo de injúria no sistema nervoso central, fato que pode ser visto através da observação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), considerada um biomarcador astrocitário (ZWIRNER *et al.*, 2021; BRENNER; MESSING, 2020).

Dessa forma, o foco do estudo foi estudar a correlação da obesidade (induzida por redução no tamanho da ninhada) com o desenvolvimento de sintomas semelhantes ao de depressão em roedores na idade pré-púbere, uma vez que as duas comorbidades possuem um crescente aumento de incidência na idade infantil como descrito anteriormente.

Portanto, a hipótese é de que os animais com obesidade precoce induzida por redução de ninhada apresentem sintomas semelhantes ao de depressão mais acentuados e que esses sintomas possam se correlacionar com alguma alteração na expressão de GFAP.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OBESIDADE

A obesidade refere-se ao excesso de gordura corporal, podendo, no adulto, ser diagnosticada de diversas formas, sendo comumente feita através da avaliação do índice de massa corporal (IMC) considerando-se obeso o indivíduo que apresentar esse índice maior que 30 kg/m² (LEVIN, 2000; WADDEN *et al.*, 2002; BESSESEN, 2008; CABALLERO, 2019).

A visão do corpo obeso está presente historicamente, antes do século XX, quando o excesso de peso era visto como sinônimo de saúde, riqueza e força, fazendo com que as pessoas idealizassem um corpo robusto. Com o passar do tempo e o avanço nos estudos percebeu-se que o excesso de peso não era vantajoso para o indivíduo, pelo contrário, poderia estar relacionado ao desenvolvimento de diversas patologias (EKNOYAN, 2006).

Hoje, sabe-se que a obesidade é uma doença crônica que predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de diversas doenças secundárias, sendo causa de incapacidade funcional, perda de qualidade e expectativa de vida. É uma patologia de causa multifatorial, ou seja, envolve diversos fatores, entre eles fatores genéticos, ambiente obesogênico, disfunções neuroendócrinas, fatores financeiros, psicológicos, entre outros (PATEL *et al.*, 2016).

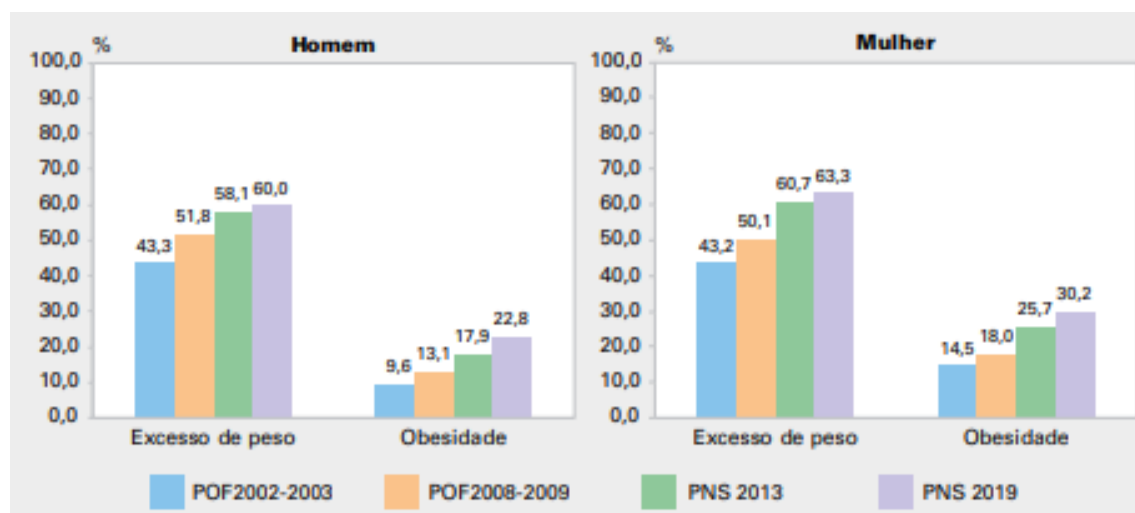
Sendo que a sobrecarga gerada pelo excesso de gordura, é capaz de desencadear diversas respostas fisiológicas no organismo, estando relacionada à elevação da produção de colesterol, tanto no fígado quanto no intestino, aumento da resistência à insulina, diabetes, hipertensão, maior desmineralização óssea, doenças cardíacas, risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer, entre outras consequências (DIETZ, 1989; BESSESEN, 2008; SHASHATY; STAPLETON, 2014; CABALLERO, 2019).

O aumento de pessoas apresentando obesidade em todo o mundo fez com que esta seja considerada uma epidemia mundial, pois, a cada dia se observa um desequilíbrio entre pessoas consideradas eutróficas e obesas e isso demonstra um grave problema de saúde pública (PATEL *et al.*, 2016).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e estatísticas (IBGE), comparam informações de quatro pesquisas realizadas entre o ano de 2002 e 2019, sendo elas

a Pesquisa de orçamento familiar de 2002-2003 (POF 2002-2003), Pesquisa de orçamento familiar (POF 2008-2009), Pesquisa Nacional de Saúde realizada em 2013 e Pesquisa Nacional de Saúde realizada em 2019 demonstrando um aumento de prevalência de sobrepeso e obesidade entre homens e mulheres adultos nesse período (FIGURA 1).

Figura 1 - Prevalência de excesso de peso e de obesidade na população adulta de 20 anos ou mais de idade, por sexo - Brasil - 2002-2003/2019.



Fonte: IBGE, 2019.

Nota: Prevalência de brasileiros adultos com sobrepeso e obesidade desde 2002 à 2019, padronizada segundo a distribuição etária, em cada sexo.

Pode-se observar um aumento gradativo no número de homens e mulheres obesos ao longo do intervalo desses dezessete anos, chegando à mais que dobrar o número de pessoas com obesidade nesse período de tempo (IBGE, 2019).

Pensando na questão de que esse excesso de peso e gordura corporal podem trazer consequências inúmeras para o organismo do indivíduo estudos atuais, tanto populacionais quanto experimentais, objetivam buscar informações dos fatores envolvidos no desenvolvimento da obesidade assim como de suas consequências para o organismo com o intuito de encontrar ações cabíveis tanto de tratamento quanto de prevenção, a fim de auxiliar na melhora da qualidade de vida da população (LEVIN, 2000).

2.2 OBESIDADE INFANTIL

A obesidade infantil também é caracterizada pelo excesso de peso corporal e tecido adiposo, porém, seu diagnóstico é realizado utilizando parâmetros diferentes dos utilizados para adultos. Para avaliação do estado nutricional da criança utiliza-se as curvas de crescimento da Organização Mundial de Saúde, sendo considerada obesa a criança que ultrapassar o percentil 97 da curva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Estudos indicam que a obesidade desenvolvida desde a infância desencadeia consequências desfavoráveis ao organismo, as quais podem ser diagnosticadas ainda na infância ou demonstrar seus primeiros sintomas na fase adulta. Há indícios de que diabetes, aterosclerose subclínica e resistência à insulina podem ser desenvolvidas logo na infância, por decorrência da obesidade. Além dessas patologias, hipertensão, doenças cardiovasculares e dislipidemias também podem ser causadas pelo excesso de peso corporal (SOMMER; TWIG, 2018).

Além disso, existe uma preocupação com a obesidade na infância pelo fato de a obesidade precoce estar relacionada ao aumento no número de células de gordura, conhecida como hiperplasia, em conjunto com o aumento do volume dessas células (hipertrofia), ao tempo que, se iniciada na fase adulta, relaciona-se apenas à hipertrofia. Esse aumento de número de células adiposas predispõe essa criança a se tornar um adulto obeso, pois, as células adiposas estarão sempre em maior quantidade, durante toda a vida (HAGER, 1981).

Contudo, a maior preocupação atualmente rodeia o fato de que o número de crianças obesas cresce de maneira acelerada, sendo considerada um grave problema de saúde pública. Segundo a Pesquisa de Orçamento Familiar (IBGE, 2010) a obesidade praticamente triplicou nos últimos 20 anos, sendo predominante em crianças entre 5 e 9 anos (BRASIL, 2010).

Segundo a Associação Brasileira para o Estudo do Sobrepeso e Obesidade (2022) o Ministério da Saúde e a Organização Panamericana da Saúde apontam que 12,9% das crianças brasileiras entre 5 e 9 anos de idade têm obesidade. Fato preocupante visto todas as consequências que a obesidade precoce pode trazer ao indivíduo.

Sabe-se que o padrão alimentar da família, o aumento da disponibilidade de alimentos altamente palatáveis, a inatividade física e outros são fatores envolvidos no processo de ganho de peso, porém, a busca por estudos mais avançados nessa área é essencial para que se consiga mudar essa realidade (REINEHR; WABITSCH, 2011).

Por isso, faz-se necessário a realização de estudos que consigam desvendar os fatores envolvidos nessa patologia, assim como mostrar a relação dessa obesidade precoce com consequências permanentes para assim buscar entender melhor essa patologia na criança e estimular a prevenção.

2.3 DEPRESSÃO

A depressão é uma síndrome psiquiátrica conhecida há muito tempo e que apresenta alta prevalência na população. O termo depressão é utilizado para diagnosticar o transtorno do humor, no qual o paciente pode apresentar humor depressivo e as vezes irritado (CANALE; FURLAN, 2006).

Essa patologia está relacionada com diversas alterações no organismo, as quais vão além de um estado de tristeza, estando ligadas à lentidão das funções psíquicas, prejuízo na capacidade de atenção e concentração, da motricidade, entre outros (CANALE; FURLAN, 2006).

Em geral, a depressão pode ser definida como:

“um processo que se caracteriza por lentificação dos processos psíquicos, humor depressivo e/ou irritável (associado à ansiedade e à angústia), redução de energia (desânimo, cansaço fácil), incapacidade parcial ou total de sentir alegria e/ou prazer (anedonia), desinteresse, lentificação, apatia ou agitação psicomotora, dificuldade de concentração e pensamentos de cunho negativo, com perda da capacidade de planejar o futuro e alteração do juízo de realidade” (CANALE; FURLAN, 2006).

Entre os transtornos psicológicos diagnosticados durante a infância a depressão é atualmente o mais evidente e que desperta interesse pelo número de diagnósticos (GORAYEBE; LIBERATORIE-JUNIOR; DOMINGOS, 2005).

A depressão infantil foi reconhecida pelo Instituto de Saúde Mental dos EUA no ano de 1975, antes disso não se acreditava que crianças poderiam sofrer de depressão. A partir de então crescem os estudos a fim desse tema que hoje é considerado o mal do século (HUTTEL *et al.*, 2011).

Isso, pois, a depressão pode trazer inúmeros prejuízos para a criança os quais englobam aspectos cognitivos, físicos, psicossocial e motor, afetando suas

habilidades, aprendizagem e toda família (CALDERARO; CARVALHO, 2005).

A depressão possui etiologia complexa, que envolve inúmeros mecanismos, um deles envolvidos aos estressores fisiológicos e físicos que desencadeiam ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal e sistema imunológico. Esses fatores podem desencadear a liberação de citocinas pró inflamatórias que contribuem para o desenvolvimento da depressão pela perda da plasticidade neural, redução de monoaminas e fator neurotrófico derivado do cérebro (BNDF), mostrando várias hipóteses para o desenvolvimento da depressão (MAIA, 2017).

Diversos modelos são utilizados para estudar esta patologia, tais como, modelo biológico, modelo comportamental, modelo cognitivo e modelo psicanalítico, cada qual leva em consideração uma linha de fatores, porém, é importante entender que os fatores se correlacionam e interagem entre si (CRUVINEL; BORUCHOVITCH, 2003).

Maia, Francisca Tassiana Souza Rodrigues (2017) indica ainda que a depressão infantil pode ocorrer por decorrência de alterações endócrinas e neurológicas. Pesquisas iniciais, realizadas em modelos animais, buscam conhecer melhor essa relação entre a depressão e fatores endócrinos e neurológicos, a fim de buscar melhores entendimentos sobre suas raízes biológicas.

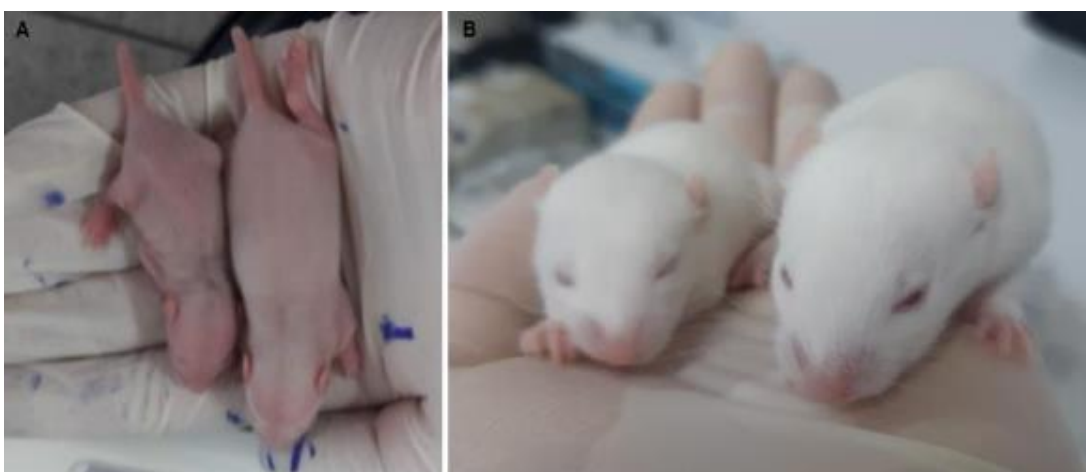
Para isso, um protocolo muito utilizado e validado para avaliar sintomas tipo depressivos em roedores, como citado anteriormente, é o teste de nado forçado que avalia o comportamento do animal frente à uma situação de perigo. Para isso, o animal é colocado em um cilindro contendo água, ao qual o animal já foi familiarizado há vinte e quatro horas, e seu comportamento é avaliado durante 5 minutos. O teste leva em consideração que em uma situação de perigo o roedor tenha o comportamento de fuga frente à situação, nadando para escapar do local, porém, em modificações comportamentais consideradas como sintomas tipo depressivos os animais apresentam comportamento diferente do habitual, mantendo-se em imobilidade, com movimento suficientes apenas para sobreviver (YANKELEVITCH-YAHAV *et al.*, 2015).

Assim, diversos estudos vêm sendo realizados com roedores a fim de relacionar aspectos situações que gerem alterações na fisiologia do animal com o desenvolvimento de sintomas tipo depressivos pelos mesmos.

2.4 MODELO DE OBESIDADE POR REDUÇÃO DE NINHADA

O modelo de desenvolvimento de obesidade por redução de ninhada é conhecido por aumentar o tamanho e peso corporal dos animais através da diminuição da competição por leite materno (FIGURA 2). Isso se dá, pois, há uma redução artificial do número de filhotes por ninhada, fazendo com que o filhote tenha sempre uma teta disponível para mamar, sem ter que competir ou dividir a fonte de alimentos com os irmãos (HABBOUT *et al.*, 2013).

Figura 2 - Diferença do tamanho de animais fêmeas de ninhada normal e ninhada reduzida no PND8 e 15.



Fonte: NOVAIS, 2020.

Nota: Comparação do tamanho de animais de ninhada normal e ninhada reduzida no PND8 (A) e PND15 (B), mostrando a diferença de tamanho dos animais de ninhada normal e reduzida.

Dessa forma, o ganho de peso ocorre de maneira mais acentuada devido a maior disponibilidade de leite materno o que caracteriza uma supernutrição no início da vida (PLAGEMAN *et al.*, 2010). Além disso, estudos indicam que com a redução do número de filhotes há uma menor necessidade de produção de leite, fazendo com que ocorra, além de uma maior disponibilidade de leite em quantidade, uma modificação na composição do mesmo, com aumento na proporção de lipídeos e triglicerídeos, o que auxilia ainda mais para o ganho de peso dos animais (KAFFMAN, MEANEY, 2007).

Como dito anteriormente há uma redução no número de animais, porém, dependendo do protocolo utilizado, há uma variação na quantidade de animais mantida no ninho. Carvalho *et al.* (2016) utilizou um protocolo contendo 3 animais na ninhada reduzida, sendo 1 fêmea e 2 machos ao passo que na ninhada normal permaneceram 12 animais, sendo 6 fêmeas e 6 machos. O mesmo foi utilizado por

Enes-Marques *et al.* (2020), mostrando que esse protocolo foi suficiente para o aumento de peso nos animais.

Novais *et al.* (2021) utilizou o protocolo de 4 animais na ninhada reduzida, sendo 2 machos e duas fêmeas, ao passo que a ninhada normal permaneceu com 12 animais, sendo 6 machos e 6 fêmeas (FIGURA 3).

Figura 3 - Imagem mostrando ninhada normal com doze filhotes e ninhada reduzida com 4 filhotes.



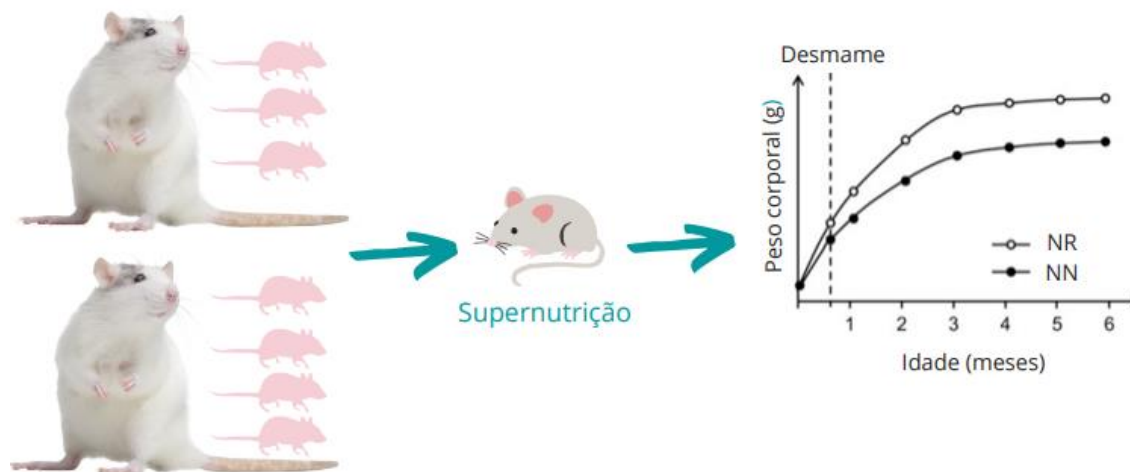
Fonte: NOVAIS, 2020.

Nota: Diferença de quantidade de animais em ninhada normal e ninhada reduzida. À esquerda caixa com animais de ninhada normal, contendo seis machos e seis fêmeas e à direita ninhada reduzida com dois machos e duas fêmeas.

Habbout *et al.* (2013) indica que tanto o protocolo de 3 quanto o de 4 filhotes na ninhada reduzida está adequado para o ganho de peso acentuado esperado pelo modelo, mostrando a eficiência do mesmo em produzir aumento do ganho de peso nos animais (FIGURA 4).

Outros estudos realizados utilizando a redução de ninhada (NR) mantendo 3 filhotes (1 macho e 2 fêmeas) para o grupo ninhada reduzida e 12 filhotes (com no máximo 6 machos por ninhada) no grupo ninhada normal (NN) demonstraram que os animais da ninhada reduzida apresentaram um aumento de peso mais acentuado desde o oitavo dia de lactação até a fase adulta (PATEL; SRINIVASAN, 2010; HABBOUT *et al.*, 2013; MOZES *et al.*, 2015; DEBARBA, 2017; ENES-MARQUES; GIUSTI PAIVA, 2018).

Figura 4 - Diagrama representando a quantidade de animais nos protocolos de ninhada reduzida e a consequência no peso dos animais.



Fonte: Adaptado de HABBOUT *et al.*, 2013.

Nota: Imagem ilustrando que o protocolo de redução de ninhada, tanto com três quanto com quatro animais por grupo é eficiente no desenvolvimento de uma supernutrição pós-natal desencadeando aumento do ganho de peso mais acentuado desde os estágios iniciais de maturação até a fase adulta do animal.

Um outro estudo com redução de ninhada utilizando ratos Wistar utilizou o protocolo de redução na proporção de 4 filhotes (NR) e 10-12 filhotes (NN) por rata lactante. Foi observado neste estudo o dobro do peso de gordura e de quantidade de leptina nos animais do grupo NR em comparação ao grupo NN, mostrando ainda que há uma relação entre a hiperinsulinemia e a resistência à leptina e desenvolvimento de obesidade ao longo da vida (SCHMIDT *et al.*, 2001).

Além disso, em alguns estudos ainda pode-se perceber variação no sexo dos animais. Rodrigues e colaboradores (2007) realizaram a indução de obesidade pelo método de redução de ninhada usando o protocolo com 4 animais, porém, todos machos, na ninhada reduzida, observando ganho de peso mais acentuado da mesma forma.

2.5 RELAÇÃO ENTRE OBESIDADE E DEPRESSÃO

Como dito anteriormente, estudos indicam uma relação bidirecional entre obesidade e depressão, o que faz com que se busque formas de elucidar a incógnita

se a obesidade leva à depressão ou se a depressão desencadeia a obesidade (AMBRÓSIO *et al.*, 2018).

Segundo a OMS (2008), problemas de saúde como doença coronariana, câncer, asma, diabetes e hipertensão podem desencadear mais comumente depressão, ansiedade e deficiência cognitiva, demonstrando assim uma correlação com a existência de algum tipo de distúrbio metabólico e o surgimento e desenvolvimento de transtornos emocionais e cognitivos. Mostrando que 52% das pessoas com doenças cardiovasculares apresentavam sintomas de depressão e que o diagnóstico de diabetes e hipertensão coexistem com os de depressão e demência, reforçando a provável relação entre as doenças crônicas não transmissíveis e as possíveis consequências neurológicas. Além disso, de acordo com Milano e colaboradores (2020) cerca de 30% dos indivíduos obesos apresentam transtornos depressivos.

Estudo realizado por Wanga *et al.* (2019) mostrou que crianças e adolescentes obesos apresentam mais diagnóstico de depressão do que os que possuem índice de massa corporal adequado, reforçando a hipótese de que a obesidade esteja ligada ao desenvolvimento de sintomas depressivos.

Ainda em busca dessa relação, Sharma e Fulton (2012) utilizaram o protocolo de dieta hipercalórica para o desenvolvimento de obesidade em ratos adultos, encontrando um aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado, mostrando a relação entre a obesidade e o desenvolvimento de sintomas tipo depressivos em animais.

Nesse contexto, Ambrósio *et al.* (2018) indica que diversos fatores podem estar envolvidos com essa relação entre obesidade e depressão, sendo eles, disfunção no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), disfunção no sistema serotoninérgico e dopaminérgico, efeito dos adipócitos no desenvolvimento de inflamação crônica, alterações na microbiota intestinal, entre outros.

A relação entre a obesidade e o desenvolvimento de um estado inflamatório crônico desencadeado pelos adipócitos no organismo já é bem conhecida, indicando que há um desenvolvimento de estado inflamatório crônico no indivíduo obeso devido ao excesso de produção de adipocinas inflamatórias pelo tecido adiposo (AZEVEDO; BRITO, 2012).

Além disso, há estudos mostrando a relação tanto da obesidade quanto da depressão com o aumento de liberação de citocinas pró-inflamatórias e a redução da

plasticidade sináptica, podendo levar ao aparecimento de sintomas semelhantes aos de depressão em animais, ao passo que citocinas anti-inflamatórias estão diminuídas no hipotálamo e córtex de animais com sintomas tipo depressivos (MENARD; HODES; RUSSO, 2016).

Mostra-se, ainda que essa ativação do sistema imune e produção exacerbada de citocinas inflamatórias pode estar relacionada à diversas alterações associadas ao aparecimento de sistemas depressivos, tais como alterações na proliferação celular, neurogênese, gliogênese, entre outras (BORSINI *et al.*, 2015; KUBERA *et al.*, 2011).

A figura 5 mostra o envolvimento do excesso de tecido adiposo no desenvolvimento de um estado inflamatório sistêmico, cujos efeitos podem atingir o sistema nervoso central causando uma neuroinflamação, a qual leva à alterações neuroquímicas que podem desencadear alterações comportamentais, como dito anteriormente.

Isso porque, ativação da produção de citocinas tanto de forma periférica quanto no sistema nervoso central ativam a micróglia, células do sistema imune cerebral, causando diversas consequências. Essa influência de citocinas sistêmicas no sistema nervoso central é possível, pois, o aumento de citocinas pró inflamatórias, desencadeado pela obesidade ou ingestão de dieta hipergordurosa pode levar a alterações na barreira hematoencefálica fazendo com que ocorra um aumento de citocinas no sistema nervoso central (MILLER; SPENCER, 2014).

Nesse sentido, o aumento de citocinas pró-inflamatórias podem interferir na sinalização de astrócitos, principais células da micróglia, que são ativadas frente a algum tipo de injúria no sistema nervoso central (ZWIRNER *et al.*, 2021; BRENNER; MESSING, 2020).

Nesse caminho estudo realizado por Levin (2000) indica a relação entre a obesidade iniciada desde a infância com alterações na plasticidade cerebral e permanência por toda a vida, indicando a importância da realização de maiores estudos sobre os mecanismos envolvidos com essa patologia no início da vida, suas consequências durante todas as fases do desenvolvimento e a da prevenção desde os primeiros anos do desenvolvimento do indivíduo.

Figura 5 - Efeito do tecido adiposo no desenvolvimento de inflamação sistêmica, neuroinflamação e alterações neuroquímicas e comportamentais.



Fonte: Adaptado de AMBROSIO *et al.*, 2018.

Nota: Imagem ilustrando as alterações geradas pela presença de tecido adiposo em excesso, desencadeando um estado inflamatório sistêmico capaz de atingir o sistema nervoso central levando a uma neuroinflamação e conseqüentemente alterações neuroquímicas e comportamentais.

2.6 CÓRTEX

O córtex envolve a superfície do cérebro e é dividido em quatro lobos, tais como frontal, parietal, temporal e occipital, cada um com suas funções específicas (ESPERIDIÃO-ANTONIO *et al.*, 2008).

O córtex frontal está relacionada com tomada de decisões e desenvolvimento de estratégias comportamentais e o controle do comportamento emocional (ESPERIDIÃO-ANTONIO *et al.*, 2008).

O córtex pré-frontal é uma região do neocórtex desenvolvida tardiamente, sendo considerada a região mais moderna do cérebro humano, é a região relacionada

com o desenvolvimento de metas e objetivos (MELO; LUCIANE; BANDEIRA RODRIGUES, 2011).

Tem, ainda, relação com as vias paralímbicas as quais são relacionadas aos aspectos bem emocionais (ROZENTHAL; LAKS; ENGELHARDT, 2004).

Além disso, estudo realizado por Rozenthal, Laks e Engelhardt (2004) traz o fato de que exames de ressonância magnética mostram alterações tais como diminuição do fluxo sanguíneo e no metabolismo no córtex pré-frontal de pessoas com depressão, mostrando alterações na função desta região em casos depressivos.

2.7 SISTEMA NERVOSO CENTRAL E ASTRÓCITOS

O sistema nervoso central é formado anatomicamente pela medula cerebral e o encéfalo, e seus hemisférios são divididos em quatro partes, sendo chamados de córtex, amígdala, núcleos da base e hipocampo, cada um com suas funções específicas (BELLAVÉR; BRUNA, 2013).

Em relação à anatomia celular, o sistema nervoso central é formado por células nervosas envolvidas por células da glia. As células da glia constituem a maior parte das células do sistema nervoso central e como o próprio significado do nome é considerada instrumento de ligação, com função de proteger os neurônios. São classificadas em micróglia, que tem sua origem de maneira imune e chegam até o cérebro pelo sangue, astrócitos, células de Schwann e oligodendrócitos que são os formadores da bainha de mielina (GUILLAMÓN-VIVANCOS; GÓMEZ-PINEDO; MATÍAS-GUIU, 2012).

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes que dentro do sistema nervoso central desempenham inúmeros papéis, tais como captação e depuração de neurotransmissores como glutamato e GABA, modulação do fluxo sanguíneo local e provisão de neurônios e axônios, participam da barreira hematoencefálica, manutenção homeostática de íons extracelulares, PH (SOFRONIEW, 2013).

São, portanto, as principais células do sistema nervoso central envolvidas na homeostase cerebral, na integridade da barreira cerebral, na sinaptogênese e na neurogênese, entre outras, podendo reagir à presença de citocinas ou até mesmo liberá-las, sendo células-chave na manutenção de condições fisiológicas e patológicas do sistema nervoso central (SEADY, MARINA PEDRA, 2018; HOLST, *et al.*, 2019).

Mesmo não gerando potencial de ação, são células que podem ser ativadas por sinais internos e externos, gerando sinais às células, em um processo chamado de gliotransmissão (GUILLAMÓN-VIVANCOS; GÓMEZ-PINEDO; MATÍAS-GUIU, 2012).

Nesse contexto, quando há insultos ao sistema nervoso tais como traumas, infecções, isquemias, doenças degenerativas ou estímulos inflamatórios os astrócitos são ativados, em um processo conhecido como astrogliose reativa. Isso porque, os astrócitos podem expressar receptores de citocinas e mediadores inflamatórios como forma de proteção do sistema nervoso central, que pode ser considerada como benéfica (SOFRONIEW, 2013).

Porém, quando reativos estes podem exercer um papel pró e antiinflamatório e inúmeras pesquisas buscam demonstrar sua relação pró inflamatória, com a liberação de mediadores que recrutam células estimulando a proliferação celular na região onde estão reativos, podendo ter potencial de desencadear efeitos prejudiciais ao sistema nervoso central, influenciando em interações sinápticas e funções neuronais (SOFRONIEW, 2013).

Estudo realizado indica que alterações nos astrócitos alteram funções neurais que podem influenciar na questão comportamental iniciando de forma sutil até atingir escalas mais perceptíveis como convulsões e neurodegeneração, reforçando que alterações primárias na função dos astrócitos podem atingir sistemas neuronais e sinápticas de forma sutil ou acentuada (TAO *et al.*, 2011).

Dessa forma, indica-se que a astrogliose reativa não é tudo ou nada, porém, tudo depende do grau do estímulo gerado ao sistema nervoso central. Quando na forma conhecida como moderada ou grave há aumento da expressão de GFAP, gerando hipertrofia tanto do corpo celular quanto das atividades desenvolvidas pelos astrócitos, podendo gerar o que se chama de cicatriz glial, que envolve reorganização tecidual e alterações teciduais, a fim de limitar a difusão de células e substâncias inflamatórias, porém, impossibilitam a regeneração axonal e migração celular (GUILLAMÓN-VIVANCOS; GÓMEZ-PINEDO; MATÍAS-GUIU, 2012).

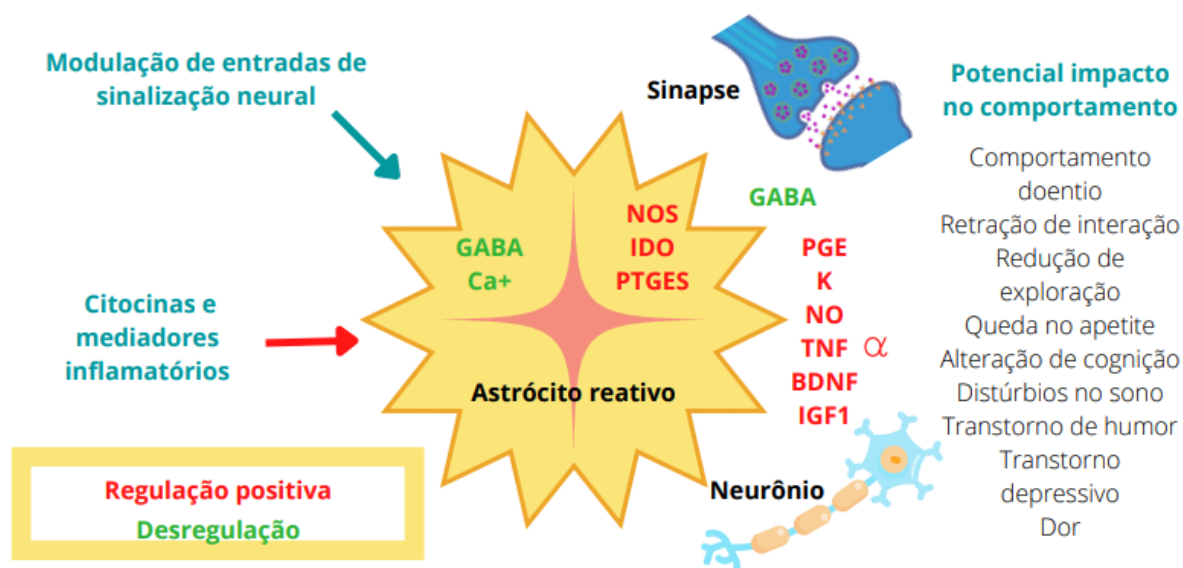
Essa reatividade dos astrócitos em busca de proteger o sistema nervoso central pode causar, portanto, um estímulo à inflamação e efeitos deletérios no sistema nervoso central (GUILLAMÓN-VIVANCOS; GÓMEZ-PINEDO; MATÍAS-GUIU, 2012).

Nesse contexto, estudos vem demonstrando a relação do estímulo inflamatório com modificações comportamentais, tais como retraimento social, atividade reduzida,

distúrbios de humor, perda de apetite, comportamentos depressivos, entre outros. Estudos realizados *in vitro* indicam que os astrócitos possuem receptores alfa adrenérgicos que em um momento reativo podem ter suas funções comprometidas, podendo ter influência na questão comportamental. Além disso, os estímulos inflamatórios também geram um aumento da expressão de indoleamina-pirrol 2,3 dioxigenase (IDO ou INDO), proteína que catalisa a degradação do aminoácido L-triptofano, mecanismo considerado como potencial para o desenvolvimento de depressão mediada por mediadores inflamatórios (DANTZER *et al.*, 2008).

A figura 6 mostra a ação dos astrócitos reativos, após estímulo de citocinas e mediadores inflamatórios, no estímulo ou desregulação de moléculas efetoras que podem influenciar as sinapses e estruturas neurais levando a possíveis alterações comportamentais como comportamento doentio, retração de interação, redução de exploração, queda no apetite, alteração de cognição, distúrbios no sono, transtorno de humor, transtorno depressivo e dor.

Figura 6 - Relação entre a ativação dos astrócitos e potencial impacto no comportamento.



Fonte: Adaptado de SOFRONIEW, 2013.

Nota: Imagem ilustrando a ação de citocinas e mediadores inflamatórios na ativação dos astrócitos levando a alterações em sinapse e neurais, impactando no comportamento.

2.8 PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL (GFAP)

GFAP é a principal subunidade proteica dos filamentos intermediários gliais, sendo a principal estrutura dos astrócitos maduros (MENARD; HODES; RUSSO, 2016; LI *et al.*, 2019).

A proteína GFAP foi a primeira proteína a ser utilizada como marcadora e hoje em dia ainda é a mais usada para identificar astrócitos maduros, sendo muito importante para identificar o processo de ativação astrogliar (GALLAND, 2017).

A expressão de GFAP pode ser detectada em ratos desde 6 semanas após a concepção, pois, nesse momento, faz parte da origem dos neurônios e oligodendrócitos e até mesmo astrócitos a partir das células gliais (HOLST *et al.*, 2019). Além disso, estudos também indicam que ele pode ser gerado em resposta a fatores benéficos como o exercício físico (SEADY, 2018).

De acordo com a revisão feita por Brenner e Messing (2021) o aumento da expressão dessa proteína no cérebro também acontece de maneira gradual durante o envelhecimento. Porém, além disso, pode haver um aumento na sua expressão frente às perturbações no sistema nervoso central, que são capazes de elevar essa proteína (BOGOSLOVSKY, *et al.*, 2016).

Vem sendo, portanto, reconhecida como um marcador de diferenciação de astrócitos, por constituir a principal proteína dos filamentos dos astrócitos maduros (GALLAND, 2017).

Isso, pois, após a ocorrência de lesões ou doenças do sistema nervoso central os astrócitos iniciam a astrogliose reativa, descrita anteriormente, caracterizada pela proliferação e hipertrofia astrocítica, aumento de expressão de GFAP e outras alterações, podendo ser benéfica ou não para o indivíduo, dependendo do contexto, do fator que a ocasionou e de sua intensidade (HOLST *et al.*, 2019).

3 JUSTIFICATIVA

Há uma grande preocupação com a atual elevação dos índices de obesidade infantil e transtornos mentais nessa faixa etária e suas consequências ao longo da vida. Dessa forma, estudar a correlação entre o desenvolvimento da obesidade na fase pré-pubere e sintomas semelhantes aos de depressão, é de grande importância para auxiliar na busca de intervenções terapêuticas que auxiliem na melhora da qualidade de vida de crianças e adolescentes que apresentam esses sintomas, além de demonstrar ainda mais a importância da prevenção da obesidade desde o início da vida, uma vez que as duas comorbidades apresentam elevado crescimento na infância.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da obesidade precoce induzida por redução de ninhada no desenvolvimento dos sintomas semelhantes aos de depressão e expressão da proteína GFAP.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São objetivos específicos:

- a) Verificar se a redução de ninhada altera o ganho de peso na fase pré-púbere;
- b) Avaliar o comportamento materno de progenitoras, submetidas ou não a redução do tamanho da ninhada no período pós-natal;
- c) Investigar o desenvolvimento dos sintomas semelhantes ao de depressão nos filhotes com obesidade desenvolvida pela redução de ninhada através dos testes comportamentais: campo aberto, comportamento social de brincar e nado forçado;
- d) Avaliar o peso dos tecidos retroperitoneal, gonadal e a glândula adrenal dos filhotes;
- e) Quantificar a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no hipocampo e córtex pré-frontal dos filhotes.

5 MATERIAIS E MÉTODO

5.1 ANIMAIS

Para o desenvolvimento do projeto foram utilizadas ratas *Wistar* adultos (250-280 gramas), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. Os animais passaram por um período de ambientação de 7 dias no Laboratório de Neuroimunomodulação e foram agrupados em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção (3 a 4 animais por caixa). Estes animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo as luzes acesas às 7:00 horas e desligadas às 19:00. Os procedimentos experimentais também foram realizados a uma temperatura controlada (23 ± 1 °C) e os animais receberam água e ração comercial *ad libitum* durante todo o período experimental. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos a CEUA da UNIFAL-MG (ANEXO 1).

5.2 DELINEAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Como pode-se observar na figura 7, após o período de ambientação, os animais foram colocados em uma caixa para acasalamento em uma proporção de 2 fêmeas para 1 macho. No dia seguinte no período da manhã, foi realizado o lavado vaginal para verificar a prenhez das ratas e se verificada a presença de espermatozoides na fase estral do ciclo da rata, considerou-se como o dia gestacional 0 (DG0). O dia do parto foi considerado como DPP0 e no DPP1, as ninhadas foram padronizadas em ninhada normal (NN = 6 machos e 6 fêmeas) ou ninhada reduzida (NR = 2 machos e 2 fêmeas). O comportamento materno foi avaliado nos dias DPP2-DPP5. As ninhadas foram desmamadas no DPP21 e os animais mantidos em caixas individuais até o início dos experimentos. Durante todo o período de lactação e até o final dos experimentos, os animais foram pesados a cada 7 dias.

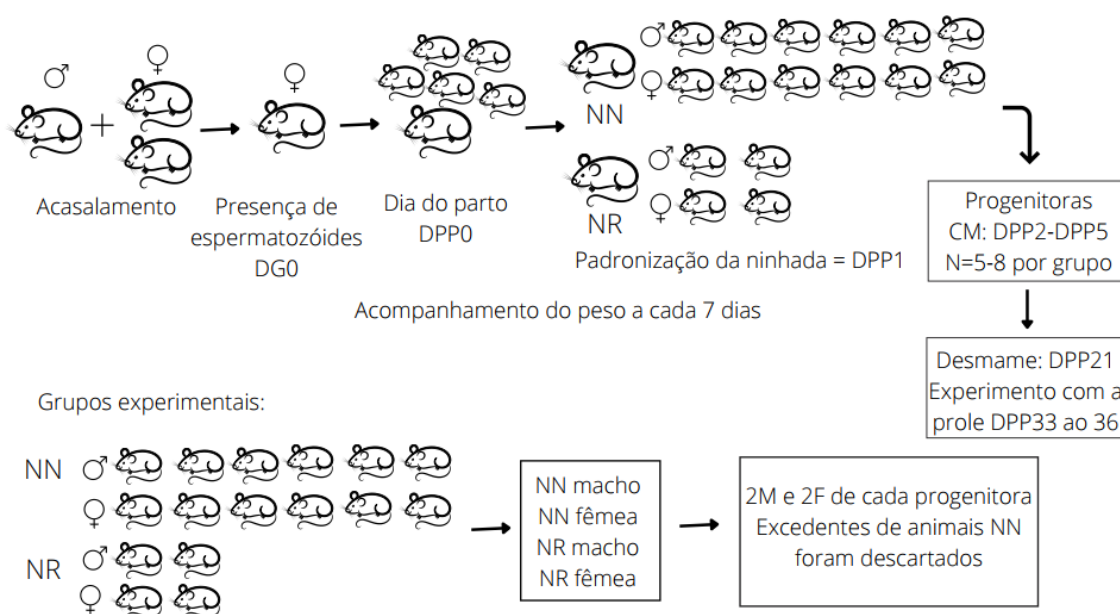
Para os procedimentos experimentais que descritos a seguir, foram utilizados 2 machos e 2 fêmeas de cada progenitora.

Assim, os grupos experimentais dos filhotes serão:

- 8 machos NN,
- 8 machos NR,
- 8 fêmeas NN,
- 8 fêmeas NR.

Animais excedentes (progenitoras após desmame e animais NN) foram devidamente descartados.

Figura 7 – Representação esquemática do delineamento experimental.



Fonte: Da autora.

Nota: Delineamento experimental mostrando desde o acasalamento até a o desmame dos filhotes e datas dos experimentos com a prole.

No DPP33, foi realizado o teste de campo aberto e no dia seguinte o teste de interação social. O treino para o teste de nado forçado foi feito no DPP35 e no DPP36 foi realizado o teste (FIGURA 8). Logo em seguida do teste do nado forçado, os animais foram eutanasiados por decaptação, o cérebro foi extraído para dissecação do córtex e hipocampo para posteriores procedimentos de *Western Blotting*; os tecidos adiposos gonadal e retroperitoneal, e glândula adrenal foram pesados.

Figura 8 – Delineamento experimental com a prole.



Fonte: Da autora.

Nota: Representação esquemática do delineamento com a prole entre os DPP33 e DPP36.

5.3 GANHO DE PESO DAS NINHADAS E FILHOTES

Os animais foram pesados a cada 7 dias, do início do experimento e até o final dos testes comportamentais, para avaliação do ganho de peso.

5.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO

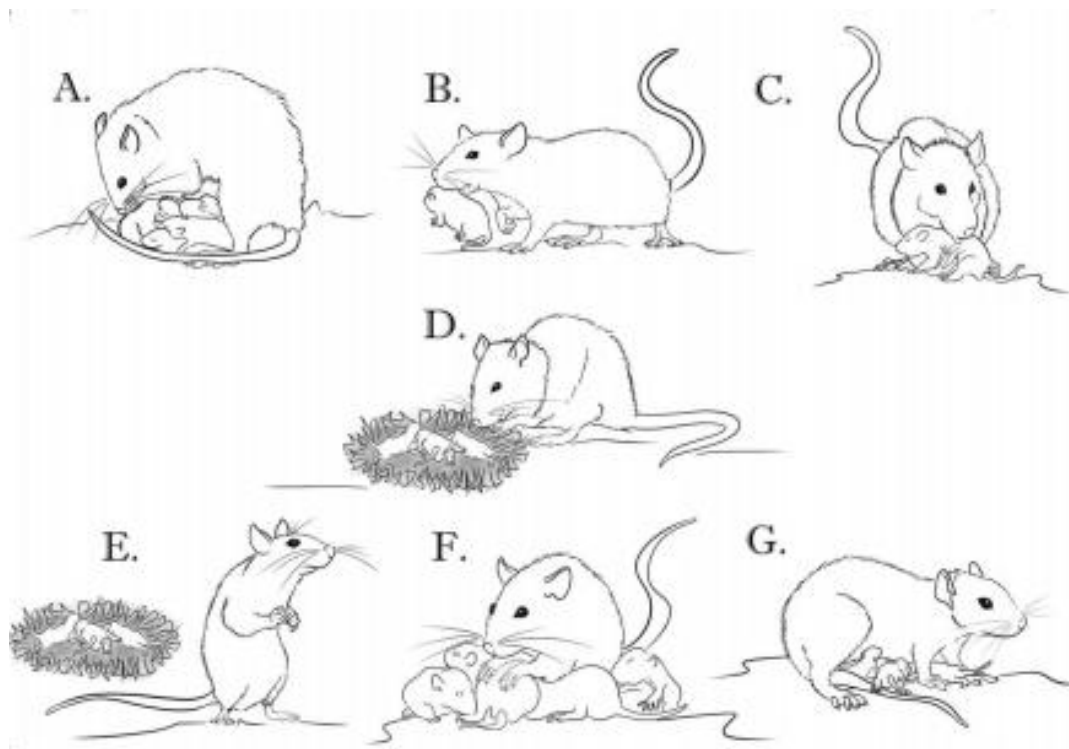
O comportamento materno das ratas lactantes foi avaliado do DPP2 ao DPP5, sendo observado o comportamento 1 vez a cada 3min, durante 3h/dia em dois períodos, das 7h30min às 9h e das 15h30min às 17h. (adaptado de VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014).

Os seguintes parâmetros comportamentais foram observados:

- Número de vezes que a rata fica sem filhotes: quando a rata estiver fora do ninho, explorando, alimentando-se, sem contato físico com os filhotes;
- Número de vezes que a rata fica lambendo filhotes;
- Número de vezes que a rata fica sobre os filhotes em posição não arqueada;
- Número de vezes que a rata fica sobre os filhotes em posição arqueada (cifose);
- Número de vezes que a rata fica em posição passiva: deitada de costas ou de lado;
- Número de vezes que a rata fica construindo o ninho: quando a rata pega o filhote pela boca ou empurra-o para o ninho;

- Número de vezes que a rata fica limpando-se (FIGURA 9).

Figura 9 - Representação esquemática de alguns parâmetros avaliados no comportamento materno.



Fonte: VERONESI, 2016.

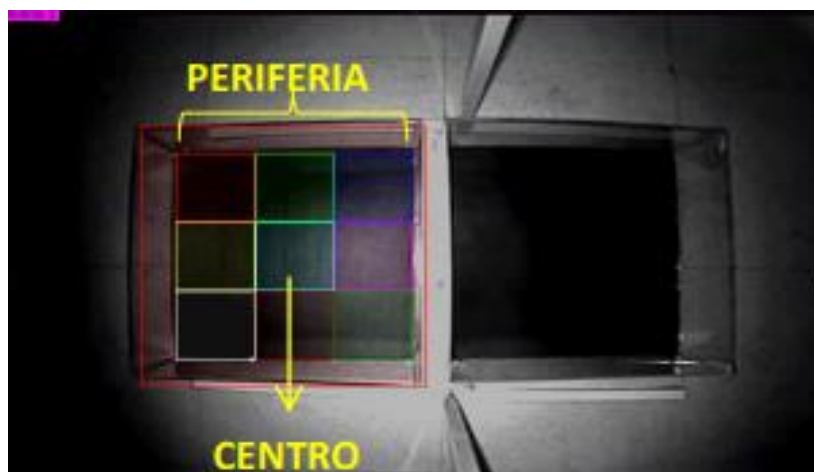
Nota: Comportamento materno observado sendo: posição de cifose (A), carregando filhote (B), lambendo filhote (pup-grooming/licking pups) (C), construindo ninho (D), fora do ninho (E), agrupando os filhotes (F), sobre os filhotes (G).

5.5 TESTE DO CAMPO ABERTO NOS FILHOTES

O teste de campo aberto foi realizado no DPP 33. É um teste útil para análise da atividade locomotora do animal, pois permite a quantificar a atividade motora espontânea (VILELA, 2009). A atividade locomotora foi avaliada no aparato do campo aberto que consiste em uma caixa quadrada de acrílico (60 cm x 60 cm x 60 cm), onde os ratos foram colocados no centro da arena e filmados por cinco minutos (FIGURA 10). Após cada teste, o campo aberto foi limpo com álcool 5%. A análise foi realizada utilizando o programa EThoVision XT 9.0, que é um sistema de observação computadorizado capaz de realizar rastreamento, análise e reconhecimento comportamental por meio de vídeos, avaliando o tempo de imobilidade e a distância

percorrida durante os cinco minutos (Noldus; Spink; Tegelenbosch, 2001). Nessa análise avaliou-se os seguintes parâmetros: distância total percorrida, distância percorrida na periferia, distância percorrida no centro, tempo em que o animal ficou sem movimento e a relação entre a distância percorrida no centro e na periferia.

Figura 10 - Representação do aparato de campo aberto e sua análise pelo programa.



Fonte: MAIA, 2017.

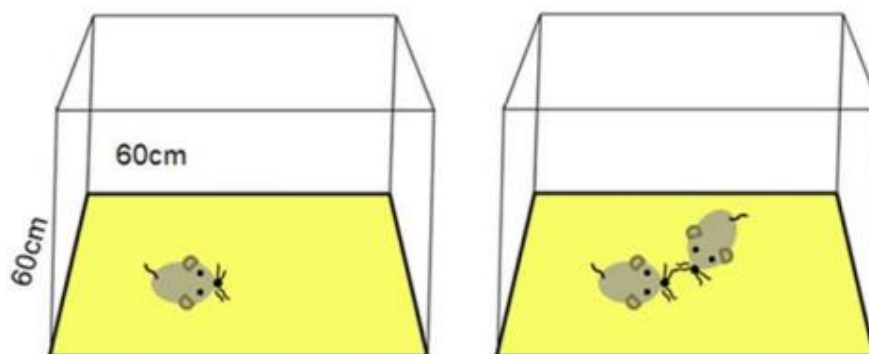
Nota: Imagem do aparato onde é realizado o teste de campo aberto. A figura da esquerda mostra uma representação de como a locomoção do animal é avaliada.

5.6 TESTE DE COMPORTAMENTO SOCIAL DE BRINCAR NOS FILHOTES

O teste de comportamento social de brincar foi realizado em uma caixa quadrada de acrílico (40 cm x 40 cm x 60 cm). Os ratos foram individualmente habituados à caixa de teste durante 10 minutos por 2 dias antes do experimento. Os animais foram mantidos em caixas individuais para aumentar sua motivação social e assim facilitar a expressão do comportamento pré-púbere de brincadeira (TREZZA; VANDERSCHUREN; 2008; TREZZA; BAARENDSE; VANDERSCHUREN, 2009). Um dia antes do teste os animais foram colocados no aparato para habituação durante 10 minutos. O teste consiste em colocar dois animais do mesmo sexo na arena de teste durante 10 minutos e as interações do comportamento pré-púbere de brincadeira foram registradas para posterior análise (FIGURA 11). A análise foi feita registrando o tempo em segundos em que cada animal interagiu com o outro animal. Com o objetivo de reduzir as interferências nas respostas comportamentais, os animais em pares não apresentaram experiência social anterior. Considerou-se como comportamento de interação o tempo de fowling (ato de seguir o parceiro), latência e tempo de sniffing

(ato de cheirar qualquer parte do corpo do parceiro, incluindo a área anogenital), frequência de push (ato de empurrar o parceiro no sentido de chamar para brincar), frequência de crawl (quando o animal passa sob ou sobre o parceiro) (MELANCIA *et al.*, 2018).

Figura 11 - Representação do teste de comportamento social de brincar.



Fonte: NOVAIS, 2020.

Nota: Aparato utilizado para realização do teste de comportamento social de brincar. Na imagem à esquerda pode-se observar o animal em habituação e na figura à direita dois animais colocados para interagir.

5.7 TESTE DO NADO FORÇADO NOS FILHOTES

O teste do nado forçado é um modelo preditivo de parâmetros tipo depressivo, desenvolvido de acordo com o método descrito por Porsolt *et al.* (1978). Utiliza-se um cilindro de acrílico, com dimensões de 24 cm de diâmetro e 60 cm de altura, preenchido com água à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ até a altura de 40 cm. O volume de água permite que o animal nada ou boie (float) sem encostar as patas ou a cauda no fundo do recipiente. Um dia antes do teste os animais foram ambientados por 15 minutos, após a sessão de natação eles foram secos com toalhas. No dia do teste (DPP 35-36), 24 horas após a ambientação, os ratos foram colocados no cilindro por 5 minutos e foi avaliado o tempo de imobilidade cronometrado durante a respectiva sessão (FIGURA 12). A análise foi realizada através da observação dos vídeos obtidos por filmagem dos cinco minutos do dia teste, cronometrando o tempo de latência para imobilidade e o tempo de imobilidade do animal (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2005; KIRKEDAL *et al.*, 2017).

Figura 12 - Representação do animal durante o teste de nado forçado.



Fonte: NOVAIS, 2020.

Nota: Imagem mostrando animal, no aparato de nado forçado, em imobilidade, mantendo movimentos suficiente apenas para boiar.

5.8 PESAGEM DOS TECIDOS ADIPOSOS

Após o final do experimento (DPP 36), como citado anteriormente, os animais foram decapitados e os tecidos retroperitoneal e perigonadal foram dissecados e imediatamente pesados. Para análise do peso dos tecidos foi realizado o peso ajustado de acordo com o peso do animal, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Peso do tecido} = (100 \times \text{peso do tecido}) / \text{peso do animal}$$

5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GFAP

Após o término dos experimentos, os animais foram eutanasiados e o hipocampo e o córtex pré-frontal dissecados e armazenados em -80°C até o momento da realização do teste de Bradford. Para a realização do teste de Bradford as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise com um coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Em seguida as amostras foram centrifugadas (9200 rpm, 15 minutos, 4°C) e a concentração de proteínas no sobrenadante quantificada pelo teste de Bradford. As amostras contendo o tampão de lise juntamente com Laemmli foram fervidas e submetidas a análise de Western blotting. As proteínas separadas por SDS-PAGE a 10% ou 12% dependendo do peso das proteínas (electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio) e em seguida transferidas para membranas de nitrocelulose com um sistema electroforético semi-

seco (Bio-Rad, Hercules, CA). A membrana foi lavada 3 vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20, bloqueada com 5% de leite desnatado e albumina em PBS durante 3 horas a temperatura ambiente e depois incubada overnight, a 4 °C com determinado anticorpo primário anti-GFAP (mouse monoclonal; 1:100; SC 33673). No dia seguinte, após 3 lavagens em PBS contendo 0,05% de Tween 20, as membranas foram incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário (1:1000; SC 33673). Após o período de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05% e depois utilizado um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de detecção ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA). Posteriormente as membranas passaram pelo processo de *stripping* seguido do bloqueio em 5% de leite desnatado em PBS durante 2 horas. Após o bloqueio as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, seguida da incubação overnight, a 4 °C com anticorpo anti-actina (1:4000, Sigma Aldrich 4700). No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário (1:2000, Abcam-ab 6789). Após incubação, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, em seguida foi utilizado o mesmo kit de detecção durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de deteco ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA) e as intensidades das bandas quantificadas utilizando um software específico da Bio-Rad. A intensidade de cada banda foi expressa em relação à da β -actina e os dados expressos normalizados para o controle (Ribeiro et al., 2020).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados pelo *software GraphPad* versão 8.0 e expressos como média \pm erro padrão da média. Para análise do comportamento materno foi utilizado o teste *t de student*. Para análise do peso foi utilizada análise de medição de repetição de duas vias de variância (2-way RM ANOVA) seguido pelo teste de Newman-Keuls, usando ninhada (NN e NR) e dias repetidos (1 a 36). Para os testes de comportamento, gorduras perigonadal, retroperitoneal e análise de

western blotting foi utilizado análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias) seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls considerando os fatores de ninhada (NN ou NR) e sexo (macho ou fêmea) como fatores. Foi realizada análise de regressão linear para testar a correlação entre a porcentagem de expressão de GFAP no córtex pré-frontal dos machos com o peso corporal, peso de gordura retroperitoneal e tempo de imobilidade no teste de nado forçado foi utilizado teste de *Pearson*. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

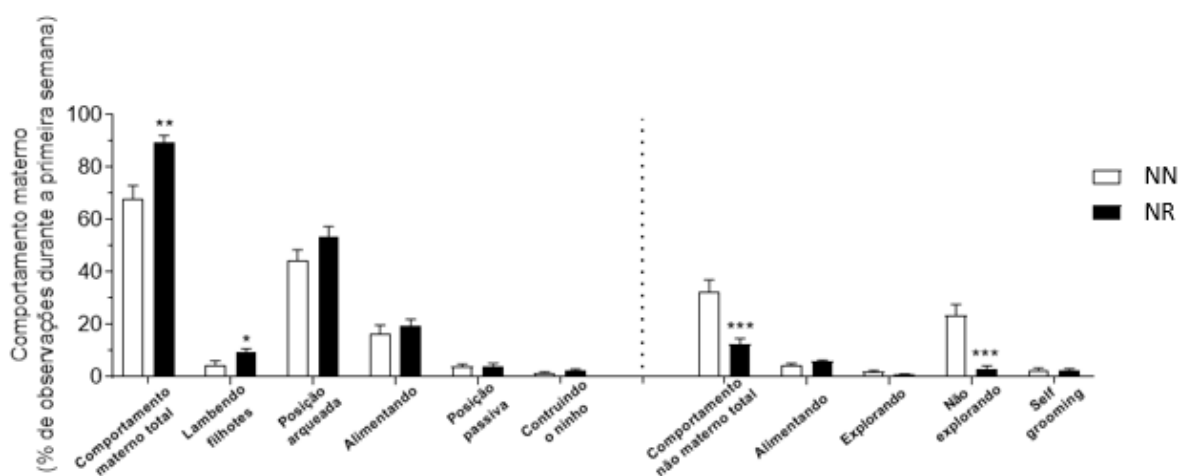
6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO

A figura 13 mostra a avaliação da porcentagem do comportamento materno de ratas do grupo ninhada normal (NN) e ninhada reduzida (NR) do 2º ao 6º dia de lactação, com comparações realizadas através do teste t para amostras independentes.

Houve aumento da porcentagem de lambidas nos filhotes ($t_{11}=2,817$, $p<0,05$) nas mães de ninhada reduzida, além de uma diminuição da porcentagem do parâmetro não materno de ficar longe da ninhada sem explorar ($t_{11}=5,768$, $p<0,001$) no grupo de ninhada reduzida quando comparado ao grupo de ninhada normal.

Figura 13 - Parâmetros maternos e não maternos das ratas lactantes de ninhada normal e ninhada reduzida.



Fonte: Da autora.

NOTA: Porcentagem do comportamento materno de lambida, cifose, sobre os filhotes, posição passiva, lambendo-se e construção do ninho e do comportamento não materno de alimentação, exploração e não exploração das ratas lactantes do grupo de ninhada normal (NN) e ninhada reduzida (NR). Os dados foram submetidos à análise de Teste *t de student* para amostras independentes. Os símbolos representam o nível de significância * $p<0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com controle (NN).

6.2 AVALIAÇÃO DOS FILHOTES

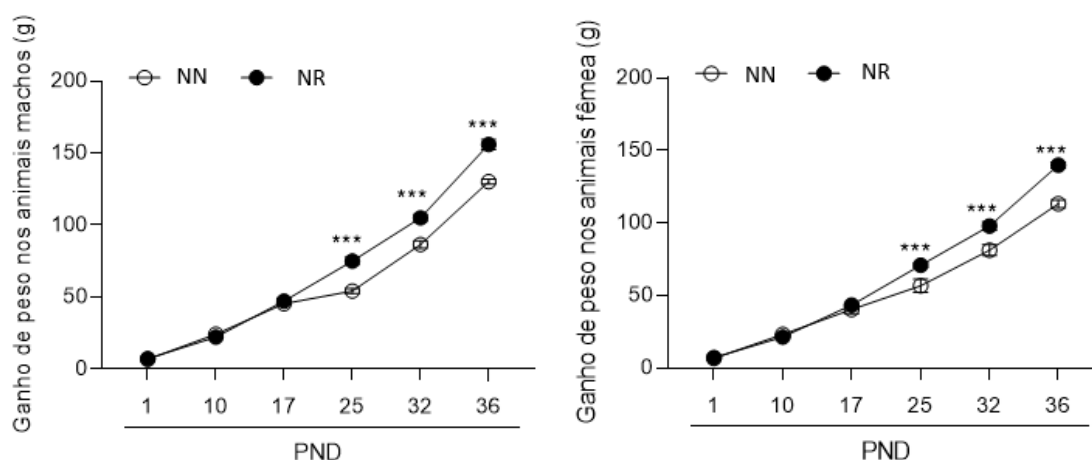
6.2.1 Ganho de peso dos filhotes

A figura 14 mostra o ganho de peso dos animais de ninhada normal e reduzida do PND1 ao PND36.

Pode-se observar que a partir do dia pós-natal 25 (PND25) houve ganho de peso mais acentuado nos animais de ninhada reduzida quando comparado aos animais de ninhada normal, tanto nos machos ($F(3,32)=43,57$; $p<0,001$; dias) quanto nas fêmeas ($F(5,160)=1832,0$; $p<0,001$).

Observa-se ainda que esse ganho de peso mais acentuado nos animais de ninhada reduzida quando comparado aos animais de ninhada normal continua no PND 32, tanto nos animais machos ($p<0,0001$) quanto nos animais fêmeas ($p<0,001$), mantendo-se o ganho no PND36, o que mostra ganho de peso mais acentuado nos animais de ninhada reduzida quando comparados aos animais de ninhada normal, tanto machos ($p<0,0001$) quanto fêmeas ($p<0,0001$).

Figura 14 - Ganho de peso corporal dos filhotes de ninhada normal e ninhada reduzida entre os PND1 e PND36.



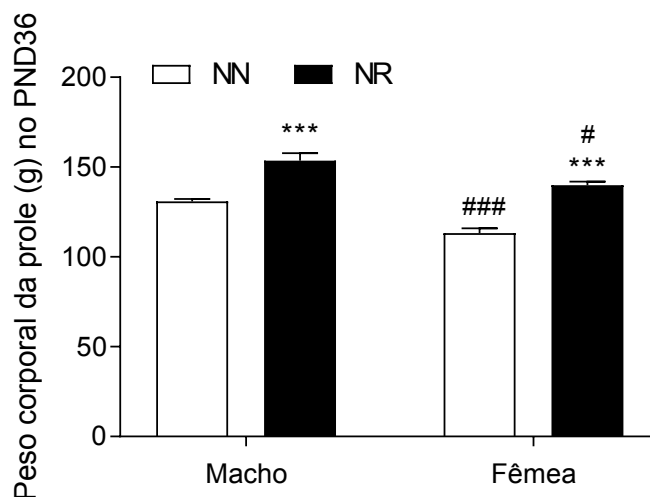
Fonte: Da autora.

NOTA: Ganho de peso corporal do PND1 ao PND36 dos animais do grupo de ninhada normal (NN) e ninhada reduzida (NR) machos (A) e fêmeas (B). Os dados foram submetidos à análise de medição de repetição de duas vias de variância (2-way RM ANOVA) seguido pelo teste de Newman-Keuls, usando ninhada (NN e NR) e dias repetidos (1 a 36). Os dados apresentados como média \pm erro padrão da média (S.E.M.), $n=8-10$ por grupo. O símbolo representa o nível de significância *** $p<0,001$ macho ou fêmea NR vs macho ou fêmea NN.

A figura 15 mostra o peso dos animais no PND36. Os animais da ninhada reduzida apresentam maior peso corporal quando comparados com os de ninhada normal, tanto fêmeas ($p<0,001$) quanto machos ($p<0,001$). Sendo que os machos apresentam

peso superior ao das fêmeas, tanto no grupo de ninhada normal quanto ninhada reduzida ($p < 0,001$).

Figura 15 - Peso dos animais de ninhada normal e ninhada reduzida no PND36.



Fonte: Da autora.

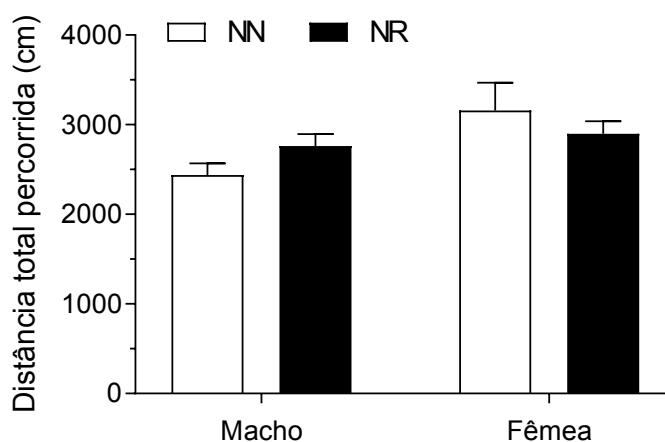
NOTA: Peso corporal no PND36 dos animais do grupo de ninhada normal (NN) e ninhada reduzida (NR). Os dados foram submetidos à análise de Teste *two way* (ANOVA) seguido pelo pós teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. Os dados apresentados como média \pm erro padrão da média (S.E.M.), $n=8-10$ por grupo. Os símbolos representam o nível de significância *** $p < 0,001$ fêmea ou macho NR vs fêmea ou macho NN; # $p < 0,05$ fêmea NN ou NR vs macho NN ou NR. ### $p < 0,001$ fêmea de NN vs fêmea de NR.

6.2.2 Atividade locomotora

A figura 16 mostra a atividade locomotora dos animais avaliadas pelo teste de campo aberto.

Observa-se que não houve diferença na atividade locomotora nos animais de ninhada reduzida quando comparados com os da ninhada normal, mostrando que a obesidade pré-púbere gerada pela redução de ninhada não afetou a atividade locomotora dos animais [$F(1,32)=0,022$, $p > 0,05$] ou sexo [$F(1,32)=4,268$, $p > 0,05$].

Figura 16 - Distância total percorrida no teste de campo aberto.



Fonte: Da autora.

NOTA: Distância total percorrida pelos animais de ninhada normal e ninhada reduzida no teste de campo aberto. Os dados foram submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias) seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls considerando os fatores de ninhada (NN ou NR) e sexo (macho ou fêmea) como fatores. Os dados apresentados como média \pm erro padrão da média (S.E.M.), n=8-10 por grupo.

6.2.3 Testes comportamentais

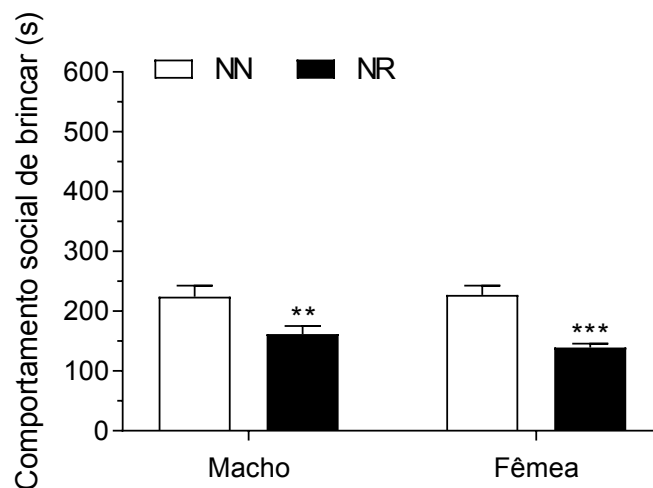
6.2.3.1 Comportamento social de brincar

A figura 17 mostra o tempo em que os animais, machos e fêmeas, de ninhada normal e reduzida, apresentaram o comportamento de brincar.

Houve redução do comportamento de brincar dos animais de ninhada reduzida quando comparados com o de ninhada normal [$F(1,32)=25,08$, $p<0,001$], sem diferença entre os sexos [$F(1,32)=0,454$, $p>0,05$].

Observa-se, portanto, redução do comportamento de brincar nos animais de ninhada reduzida quando comparados aos de ninhada normal, tanto machos quanto fêmeas ($p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente).

Figura 17 - Tempo de interação no teste de comportamento social de brincar realizado com os animais de ninhada normal e ninhada reduzida.



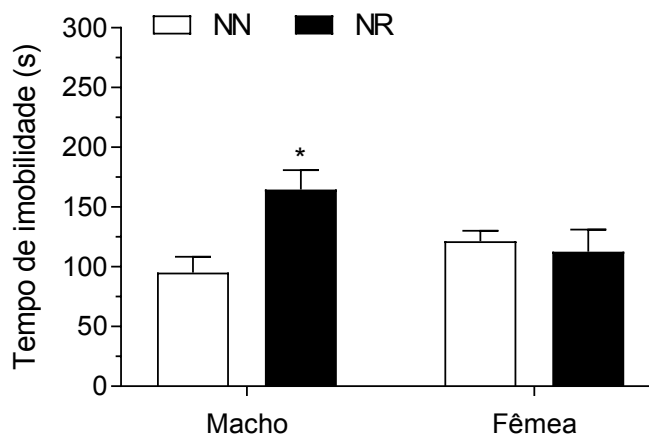
Fonte: Da autora.

Nota: Comportamento social de brincar de filhotes machos e fêmeas NN: ninhada normal e NR: ninhada reduzida. Os dados foram submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias) seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls considerando os fatores de ninhada (NN ou NR) e sexo (macho ou fêmea) como fatores. Os dados apresentados como média \pm erro padrão da média (S.E.M.), $n=7-10$ por grupo. Os símbolos representam o nível de significância * $p<0.05$, ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$ fêmea e macho de NR vs fêmea e macho de NN.

6.2.3.2 Nado forçado

A figura 18 mostra a avaliação do teste de nado forçado dos animais machos e fêmeas de ninhada normal e reduzida. Pode-se observar que a redução de ninhada aumentou o tempo de imobilidade nos animais machos [$F(1,32)=4,457$, $p<0,05$], não havendo diferença entre os sexos [$F(1,32)=0,820$, $p>0,05$].

Figura 18 - Tempo de imobilidade no teste de nado forçado realizado com os animais de ninhada normal e ninhada reduzida.



Fonte: Da autora.

Nota: Tempo de imobilidade dos animais machos e fêmeas de ninhada normal (NN) e ninhada reduzida (NR). Os dados foram submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias) seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls considerando os fatores de ninhada (NN ou NR) e sexo (macho ou fêmea) como fatores. Os dados apresentados como média \pm erro padrão da média (S.E.M.), $n=7-10$ por grupo. O símbolo * representa o nível de significância $*p<0,05$ macho NR vs macho NN.

6.2.4 Pesagem de gordura perigonadal e retroperitoneal dos animais

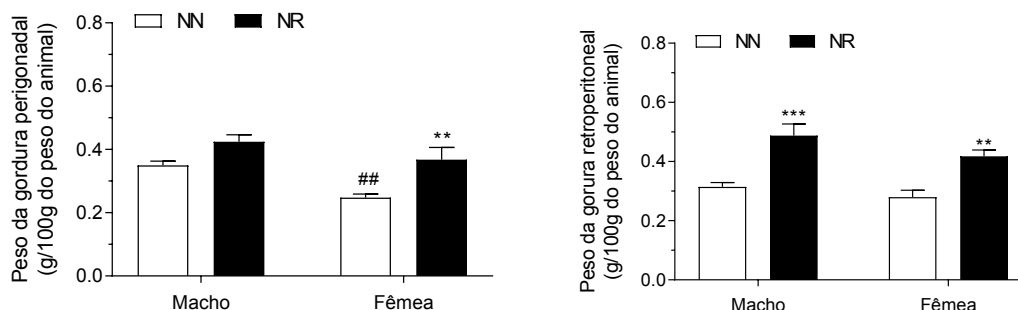
A figura 19 mostra a quantidade de tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal dos animais de ninhada reduzida e ninhada normal.

Observa-se que a redução de ninhada gerou efeito significativo em relação ao aumento de gordura tanto para os machos quanto para as fêmeas, não havendo diferença entre os sexos. Tanto para a gordura retroperitoneal [ninhada reduzida, $F(1,32)=41,24$, $p<0,001$; sexo, $F(1,32)=4,62$, $p<0,05$ e interação, $F(1,32)=0,555$, $p>0,05$] quanto para perigonadal [ninhada reduzida, $F(1,32)=17,08$, $p<0,001$; sexo, $F(1,32)=11,28$, $p<0,01$ e interação, $F(1,32)=0,898$, $p>0,05$].

O teste de comparação mostra que os animais de ninhada reduzida, tanto machos quanto fêmeas possuem maior quantidade de tecido adiposo retroperitoneal que os de ninhada normal ($p<0,001$ e $p<0,01$, respectivamente).

Observa-se ainda maior quantidade de gordura perigonadal nos animais fêmeas de ninhada normal ($p<0,01$) quando comparados com os machos de ninhada normal.

Figura 19 - Peso dos tecidos adiposos perigonadal e retroperitoneal dos animais de ninhada normal e ninhada reduzida.



Fonte: Da autora.

NOTA: Peso dos tecidos adiposos perigonadal e retroperitoneal dos animais do grupo de ninhada normal (NN) e ninhada reduzida (NR). Os dados foram submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias) seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls considerando os fatores de ninhada (NN ou NR) e sexo (macho ou fêmea) como fatores. Os dados apresentados como média \pm erro padrão da média (S.E.M.), $n=7-10$ por grupo. Os símbolos representam o nível de significância ** $p < 0,05$ macho NR vs macho NN; *** $p = 0,001$ fêmea NR vs fêmea NN; # $p = 0,01$ fêmea NN vs macho NN.

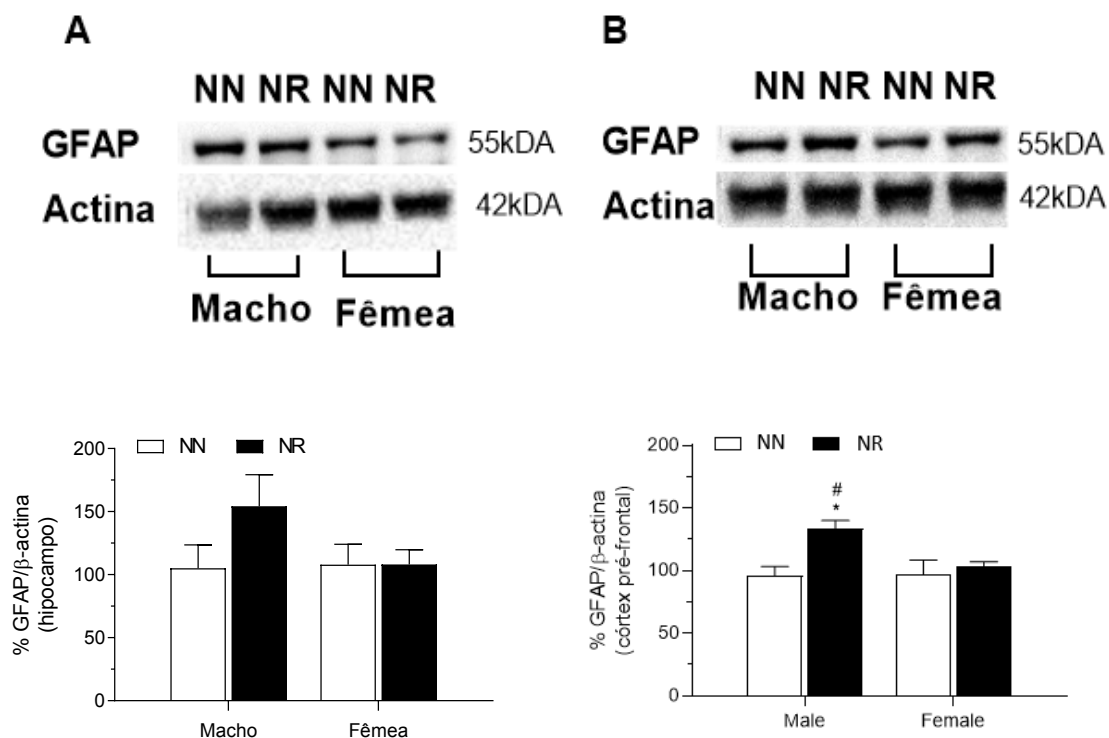
6.2.5 Western Blotting

A figura 20 mostra a quantificação da expressão da proteína GFAP na estrutura encefálica Hipocampal e córtex pré-frontal dos filhotes machos e fêmeas de ninhada normal e ninhada reduzida.

Observa-se que não houve diferença na quantificação expressão da proteína GFAP no hipocampo dos animais de ninhada reduzida quando comparado com os de ninhada normal [ninhada reduzida, $F(1,20)=1,768$, $p > 0,05$; sexo, $F(1,20)=1,368$, $p > 0,05$ e interação, $F(1,20)=1,757$, $p > 0,05$]. Porém, observou-se maior quantidade de expressão da proteína GFAP no córtex pré-frontal dos animais machos de ninhada reduzida quando comparados aos de ninhada normal [ninhada reduzida, $F(1,20)=7,867$, $p < 0,05$].

Observou-se ainda que entre os animais de ninhada reduzida os machos apresentaram maior expressão de GFAP que as fêmeas ($p < 0,05$).

Figura 20 - Quantificação de GFAP no hipocampo e córtex dos animais de ninhada normal e ninhada reduzida.



Fonte: Da autora.

Nota: Quantificação da expressão da proteína GFAP e perfil da expressão de GFAP e actina no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de animais machos e fêmeas dos grupos de ninhada normal e reduzida. Os dados foram submetidos à análise de Teste *two way* (ANOVA) seguido pelo pós teste de *Tukey* com valores expressos como média \pm EPM e representam a média de 6 animais por grupo. Os símbolos representam o nível de significância * $p < 0,05$ macho NR vs macho NN; # $p < 0,05$ macho NR vs fêmea NR.

6.2.6 Correlação entre a porcentagem de expressão de GFAP no córtex pré-frontal com o peso corporal dos animais, peso de gordura retroperitoneal e tempo de imobilidade no teste de nado forçado

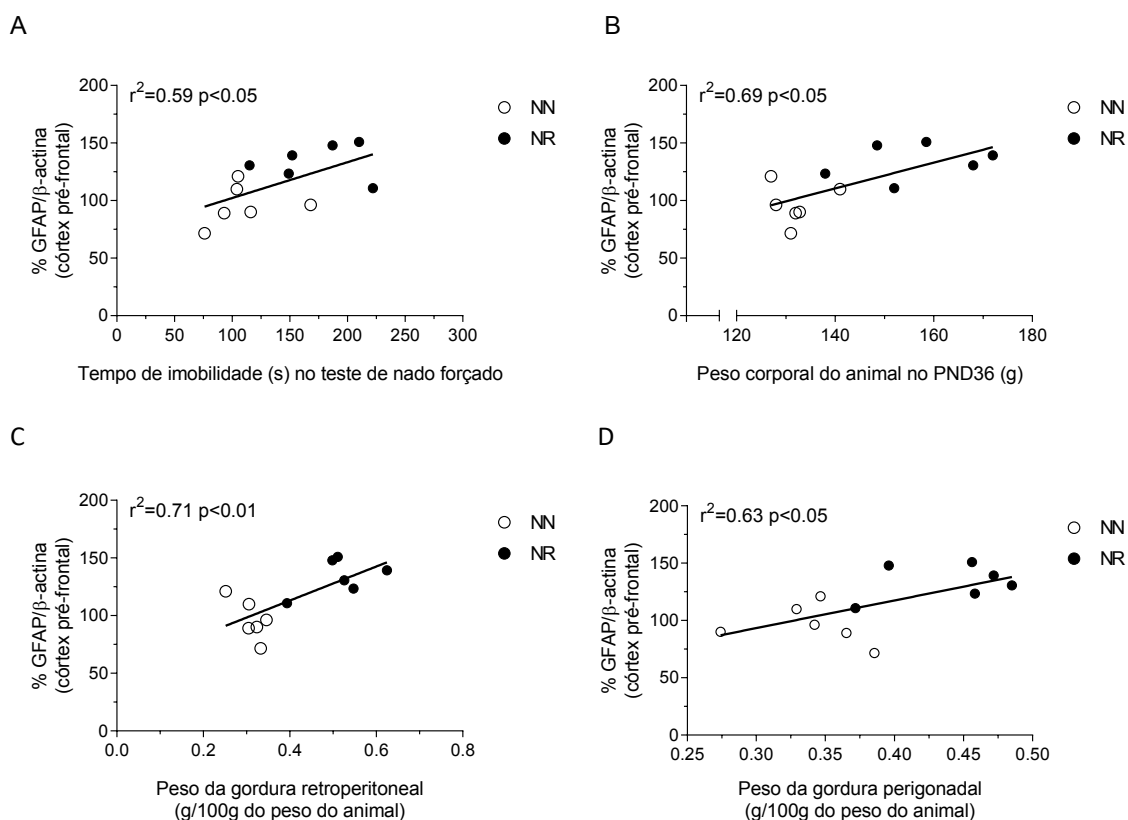
As correlações de Pearson foram realizadas para os grupos de animais machos de ninhada normal e ninhada reduzida e sua classificação foi considerada de acordo com os valores de r (coeficiente de correlação de Pearson) como: pequenas (0,10-0,29); moderada (0,30- 0,49); grande (0,50-0,69); muito grande (0,70-0,89); quase perfeito (0,90-0,99) e perfeito (1,0) (HOPKINS *et al.*, 2009).

A figura 21 mostra a correlação entre o tempo de imobilidade no teste de nado forçado, o peso corporal do animal, a quantidade de gordura retroperitoneal e epididimal e a porcentagem de expressão da proteína GFAP no córtex pré-frontal. A

análise regressão linear indicou correlação positiva entre a porcentagem de expressão de GFAP no córtex pré-frontal dos machos da prole de ninhada reduzida e o aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado [$r^2=0,591$; $F(1,10)=5,384$, $p=0,04$, figura 21 A].

O peso corporal no PND36 [$r^2=0,699$; $F(1,10)=9,575$, $p=0,01$, figura 21B], a quantidade de gordura epididimal [$r^2=0,714$; $F(1,10)=10,41$, $p=0,009$, figura 21C] e perigonadal [$r^2=0,630$; $F(1,10)=6,607$, $p=0,02$, figura 21 D] também apresentaram correlação positiva com a porcentagem de GFAP expressa no córtex pré-frontal dos animais machos de ninhada reduzida.

Figura 21 - Correlação entre o peso corporal do animal e a % de expressão de GFAP no córtex pré-frontal.



Fonte: Da autora.

Nota: Correlação entre o tempo de imobilidade no teste de nado forçado (A), o peso corporal do animal no PND36 (B), a quantidade de gordura retroperitoneal (C) e epididimal (D) e a porcentagem de expressão da proteína GFAP no córtex pré-frontal.

7 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que mães de ninhada reduzida apresentam um aumento do parâmetro materno de lambidas e diminuição do não materno de ficar longe do filhote sem explorar. Em relação aos filhotes, os de ninhada reduzida apresentaram maior ganho de peso desde o DPP25 até o 36, quando comparados com os de ninhada normal. No DPP36 os animais de ninhada reduzida apresentaram maior peso corporal e maior quantidade de gordura retroperitoneal quando comparado aos de ninhada normal. Em relação à quantidade de gordura perigonadal não houve diferença entre os animais machos de ninhada reduzida e normal, porém, as fêmeas de ninhada reduzida apresentaram maior quantidade de gordura perigonadal que as de ninhada normal.

Em relação aos testes comportamentais, não foi observada diferença nos parâmetros avaliados no teste de campo aberto, mostrando que a redução de ninhada não interferiu na atividade locomotora dos animais. No teste de comportamento social de brincar houve diminuição da interação dos animais de ninhada reduzida quando comparados aos de ninhada normal. No teste de nado forçado não houve diferença entre as fêmeas, porém, os machos de ninhada reduzida apresentaram maior tempo de imobilidade no teste quando comparados aos de ninhada normal. Na avaliação da expressão da proteína GFAP observou-se aumento da expressão dessa proteína no córtex pré-frontal dos animais machos de ninhada reduzida quando comparado aos de ninhada normal. Não houve diferença nos animais do sexo feminino.

O análise de correlação de *Pearson* mostrou grande correlação entre o peso corporal com a porcentagem de expressão da proteína GFAP, muito grande correlação entre a quantidade de gordura retroperitoneal e a porcentagem de expressão da proteína GFAP e grande correlação entre o tempo de imobilidade no teste de nado forçado com a porcentagem de expressão da proteína GFAP nos animais machos.

O comportamento materno é conhecido como o evento mais importante das mães de mamíferos, pois, é à partir do cuidado materno que se garante a sobrevivência, o desenvolvimento e o bem estar dos filhotes (BRIDGES, 2015; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2011).

Sabe-se ainda que o cuidado materno pode “programar” de forma duradoura o desenvolvimento endócrino, neuronal e comportamental dos filhotes (KAFFMAN; MEANEY, 2007; ENES; GIUSTI PAIVA, 2018).

O presente estudo demonstra que a redução de ninhada levou a um aumento dos parâmetros maternos de lambidas das mães em período de lactação. Essa estimulação tátil ocorrida pelo comportamento de lambar os filhotes gera nos mesmos um equilíbrio do eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA) protegendo contra os efeitos catabólicos dos glicocorticóides, além de estimular a liberação de hormônio de crescimento, estando assim associada a melhor desenvolvimento dos animais (MEANEY, 2001), dessa forma, o aumento desse comportamento das mães de ninhada reduzida auxilia no desenvolvimento dos filhotes.

Ao mesmo tempo pode-se observar, no presente estudo, que as mães de ninhada reduzida passaram menos tempo longe de seus filhotes, sem explorar. Estudos indicam que a melhora dos cuidados parentais está ligada à melhores resultados em testes comportamentais, com melhora na ansiedade e cognição, mostrando assim, a influência do cuidado materno com a neuroplasticidade e o neurodesenvolvimento dos filhotes (MEANEY, 2001; KAFFMAN; MEANEY 2007).

Dessa forma, o aumento dos cuidados maternos e diminuição dos não maternos apresentados são importantes para o desenvolvimento dos filhotes. Estudo realizado por Enes-Marques e Giusti-Paiva (2018), utilizando ninhada reduzida, com o protocolo de 3 animais no grupo de ninhada reduzida (1 macho e 2 fêmeas) e 12 animais no grupo de ninhada normal (com no máximo 6 machos) apresenta achados que corroboram com o presente trabalho, demonstrando um aumento de parâmetros maternos e uma diminuição de parâmetros não maternos em ratas lactentes de ninhada reduzida. Esse aumento de parâmetros maternos e diminuição dos não maternos pode estar relacionado ao fato de que, com a diminuição do número de filhotes há um menor requerimento de nutrientes da lactente fazendo com que ela precise passar menos tempo em busca de alimentação e possa dedicar maior parte do tempo ao cuidado dos filhotes (CARVALHO, *et al.*, 2016; ENES-MARQUES; GIUSTI-PAIVA, 2018).

Isso demonstra que a redução de ninhada não interfere de maneira negativa no comportamento materno, não estando relacionada à prejuízos no desenvolvimento dos filhotes por fatores envolvidos na negligência materna durante o período inicial de desenvolvimento.

Em relação aos filhotes, no presente estudo, a redução da ninhada levou a um aumento no peso corporal dos filhotes de maneira precoce, mostrando que a diminuição do número de filhotes auxilia no aumento do ganho de peso e gordura corporal dos mesmos, sendo considerados animais com sobrepeso/obesidade. Diversos fatores estão ligados ao desenvolvimento desse excesso de massa corporal, sejam eles metabólicos, ambientais e alimentares e a relação entre a presença de tais fatores desde os períodos iniciais de desenvolvimento e suas consequências é conhecida como programação metabólica. Dessa forma, a supernutrição no início da vida pós-natal é caracterizada como um fator de risco para o desenvolvimento de obesidade (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Em estudos com animais o protocolo de redução de ninhada utilizado em nosso trabalho, caracterizado pela redução artificial do número de filhotes, é um modelo animal estabelecido de supernutrição neonatal, capaz de desenvolver sobrepeso e deposição de gordura corporal nos animais em um breve período de tempo. Isso ocorre, pois, há uma redução no número de filhotes em um ninho onde o desempenho lactacional da mãe é preservado, levando à uma maior disponibilidade de leite para os filhotes (PLAGEMAN *et al.*, 2010). Além disso, achados evidenciam que a redução do número de filhotes pode estar relacionada à uma modificação na quantidade e qualidade do leite, alterando sua composição, com aumento na proporção de lipídeos e triglicerídeos (KAFFMAN; MEANEY 2007).

Estudo realizado por Plageman *et al.* (2010) avaliou a quantidade de leite ingerida pelos animais de ninhada normal e reduzida no PND10 e PND21, mostrando que os animais de ninhada reduzida mamam maior quantidade de leite quando comparados aos de ninhada normal. Além disso, no mesmo estudo os autores avaliaram mudanças na composição do leite, encontrando que o leite das ratas de ninhada reduzida possui maior concentração de triglicerídeos quando comparados com o leite das mães de ninhada normal. Essas modificações estão relacionadas com o aumento de peso mais acentuado nos animais de ninhada reduzida quando comparados com os de ninhada normal.

Nesse sentido, nossos estudos corroboram com o realizado por Carvalho e colaboradores (2016) que utilizou o protocolo de redução de ninhada utilizando 3 animais para o grupo de ninhada reduzida (1 macho e 2 fêmeas) e 12 animais para o grupo de ninhada normal (6 machos e 6 fêmeas) e encontrou ganho de peso maior em animais pertencentes à ninhada reduzida desde o PND6 até o PND21 quando

comparados aos de ninhada normal, mostrando que, a redução artificial de ninhada é eficiente em elevar o ganho de peso dos animais em uma proporção maior quando comparado às ninhadas de tamanho normal. O trabalho não apresenta as variações de peso após esta data, mas demonstra que o ganho de peso dos animais de ninhada reduzida foi constante e superior ao dos animais de ninhada normal em todas as pesagens, tanto nos machos quanto nas fêmeas.

Esse ganho de peso mais acentuado nos animais de ninhada reduzida também é mostrado no estudo de revisão feito por Habbout *et al.* (2013) que fizeram uma comparação do ganho de peso de animais de ninhada reduzida (3 a 4 animais por grupo) e ninhada normal (10 a 12 animais por grupo), mostrando ganho de peso maior nos animais de ninhada reduzida após o desmame, quando comparados aos de ninhada normal, indicando que esta diferença no ganho de peso se inicia no período pré-púbere e continua na fase adulta. Os autores relatam ainda sobre a diferença entre a utilização do protocolo de ninhada reduzida e outros protocolos que podem induzir a obesidade, indicando que o protocolo de redução de ninhada é mais realista, ao ponto que gera uma elevação em média de 30% do peso do animal, sendo o mais indicado para estudos, pois, induz uma obesidade moderada, a qual não é revertida com mudança na ingestão alimentar, mostrando sua relação com a programação metabólica no período pré-púbere.

Como relatado anteriormente, em nossos estudos pode-se observar o ganho de peso após o PND25, ou seja, após o desmame, mostrando que o ganho de peso dos animais ocorre de maneira precoce, podendo, portanto, ser relacionado à obesidade pré-púbere.

Além do aumento no peso corporal, no presente estudo, pode-se observar aumento de tecido adiposo retroperitoneal em animais machos e fêmeas de ninhada reduzida e aumento de tecido perigonadal em animais fêmeas de ninhada reduzida.

Estudo realizado por Enes-Marques *et al.* (2020) utilizando o protocolo de redução de ninhada com 3 animais por grupo (1 fêmea e 3 machos) e ninhada normal com 12 animais por grupo (6 fêmeas e 6 machos) avaliou a quantidade de gordura retroperitoneal no PND60 e encontrou um aumento desse tecido adiposo nos animais de ninhada reduzida quando comparados ao de ninhada normal, além de um aumento de tecido adiposo epididimal nos animais machos de ninhada reduzida, indicando que a redução de ninhada foi capaz de desenvolver obesidade nos animais.

Em nossos estudos esse aumento de tecido adiposo retroperitoneal em machos e fêmeas e gonadal nas fêmeas já pode ser visto no PND36, mostrando que a redução de ninhada foi capaz de desencadear a obesidade desde o período pré-púbere, sendo considerada obesidade precoce.

Outros dois estudos realizados utilizando o protocolo de redução de ninhada com 3 animais para ninhada reduzida e 10 animais para ninhada normal também encontraram aumento de tecido adiposo nos animais no PND180, ou seja, na fase adulta. Ambos os estudos avaliaram todo o tecido adiposo visceral, não diferenciando os tecidos avaliados, porém, os resultados encontrados indicam e reiteram que a supernutrição no período pós-natal, induzida pela redução de ninhada, leva a um aumento de tecido adiposo, caracterizando obesidade (CUNHA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2011).

Além disso, Rodrigues *et al.* (2011) avaliou a quantidade de gordura visceral, considerando os tecidos mesentérico, epididimal e retroperitoneal, de animais de ninhada normal e reduzida no PND21 e PND180 encontrando uma maior quantidade de tecido adiposo visceral nos animais de ninhada reduzida desde o desmame até a fase adulta, confirmando o efeito da redução de ninhada no desenvolvimento de obesidade precoce no animal.

Em nossos estudos esse aumento de tecido adiposo retroperitoneal foi visto no PND36, mostrando que a redução de ninhada foi capaz de desencadear a obesidade desde o período pré-púbere, sendo considerada obesidade precoce.

Observou-se, portanto, até o momento que a redução de ninhada levou à um aumento de peso e tecido adiposo nos animais tanto do sexo feminino quanto do sexo masculino quando comparados aos de ninhada normal, no PND36, reiterando que a supernutrição no período pós-natal é capaz de desencadear um estado de obesidade ainda na fase pré-púbere.

A obesidade vem sendo relacionada, em estudos experimentais, com alterações comportamentais, entre elas o aparecimento de sintomas tipo depressivos em animais. Isso, pois, estudos indicam que o tecido adiposo pode ser capaz de liberar mediadores inflamatórios, que podem agir por todo o organismo desencadeando alterações comportamentais (LACERDA; MALELHEIROS; ABREU, 2016).

Porém, ainda não foi estudado se na fase pré-púbere a relação entre o excesso de tecido adiposo, seu conseqüente e conhecido estado inflamatório e o desenvolvimento de alterações comportamentais.

Salari *et al.* (2018) realizou testes comportamentais com camundongos adultos obesos, com obesidade induzida pelo protocolo de redução de ninhada contendo 4 animais na ninhada reduzida e 16 animais na ninhada normal, os quais incluíram o teste de campo aberto. Neste teste não foi observada diferença entre os animais de ninhada reduzida e ninhada normal nos parâmetros de cruzamentos totais e rearings, mostrando que a redução de ninhada não levou à alteração na locomoção dos animais.

Estudo realizado por Ryan e Wehmer (1975) também utilizou o protocolo de ninhada reduzida, com número de animais não especificados no método, mostrando que a obesidade induzida pela redução de ninhada não alterou a atividade locomotora em ratos adultos.

O mesmo foi observado no presente estudo onde a redução de ninhada e a obesidade induzida por ela não apresentou efeitos significativos nos parâmetros avaliados no teste de campo aberto, mostrando que o protocolo de redução de ninhada leva a um aumento de peso e gordura corporal, porém, não afeta a mobilidade dos animais.

Estudo realizado com outro modelo de indução de obesidade, chamado de dieta de cafeteria, onde os animais foram alimentados durante 8 semanas após o desmame com uma dieta composta por bacon, biscoito recheado, queijo, pastel, cenoura, leite e açúcar, ou seja, alimentos hipercalóricos, para indução da obesidade, mostrou uma diminuição da distância percorrida no teste de campo aberto, podendo estar ligada a um prejuízo na locomoção dos animais (CIGARROA *et al.*, 2016).

Outro estudo realizado por Almeida-Shuhett *et al.* (2017) também utilizou o protocolo de dieta de cafeteria para o desenvolvimento de obesidade e encontrou uma alteração na locomoção dos animais obesos quando com parados aos de peso adequado, no teste de campo aberto, encontrando diminuição da velocidade e da distância percorrida durante o teste.

Isso reforça a importância da utilização do protocolo de redução de ninhada para a indução de obesidade e avaliação de seus efeitos em testes comportamentais, visto que, a alteração de mobilidade pode gerar alterações nos parâmetros de outros testes, o que, provavelmente, não ocorre no caso do presente estudo, pois, não houve alteração na locomoção dos animais.

Outro teste comportamental realizado no presente estudo foi o de comportamento social de brincar. O comportamento social vem sendo observado em

diversas espécies, inclusive em humanos, pois, o comportamento social apresentado no início do desenvolvimento tende a remeter o comportamento na fase adulta (VITOR-VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2021).

Em animais, o comportamento social vem sendo cada vez mais reconhecido como importante para o desenvolvimento do filhote, pois, é a primeira forma de interação comportamental não direcionada pela mãe, sendo considerado a principal forma de interação social (VANDERSCHUREN *et al.*, 1997).

Brincar é essencial para o animal no período de vida entre PND30-40 e o que reforça essa questão é o fato de que, após, período de isolamento observa-se uma tendência de aumento nesse comportamento (TERRANOVA *et al.*, 1993; VANDERSCHUREN *et al.*, 1997; VARLINSKAYA *et al.*, 1999; AVILA *et al.*, 2020). Quando submetidos ao teste de comportamento social de brincar, após um período de isolamento social, os animais tendem a exibir interação social de forma acentuada, perseguindo, cutucando, atacando e cheirando o outro como forma de interação e reconhecimento. Durante essa interação há a possibilidade de que um dos animais entre em contato com o outro e essa interação seja recíproca, porém, em algumas situações o animal solicitado pode não corresponder à interação social, fugindo (VANDERSCHUREN; TREZZA, 2013; VITOR-VIEIRA *et al.*, 2021).

No presente estudo, a obesidade, gerada pela redução de ninhada levou a uma diminuição na interação social dos animais, no PND34, mostrando que o excesso de peso e gordura corporal interferiu na motivação dos animais para esse comportamento lúdico característico da idade. Para excluir a possibilidade de que o excesso de peso por si só tenha interferido nessa diminuição de motivação por dificultar a mobilidade é importante retomar ao fato de que estes mesmos animais não apresentaram alteração de locomoção no teste de campo aberto, portanto, a falta de motivação encontrada no teste de comportamento social de brincar está relacionada a diminuição de motivação para interagir e não com dificuldade de movimentação, o que pode ser indicativo de um comportamento tipo depressivo.

Trabalho realizado por Carvalho e colaboradores (2016) utilizou o protocolo de redução de ninhada reduzida de 3 animais por grupo (1 fêmea e 2 machos) e ninhada normal de 12 animais por grupo (6 machos e 6 fêmeas) e realizou o teste de comportamento social de brincar no PND30, encontrando diminuição do comportamento de ataque nos animais machos de ninhada reduzida quando

comparado aos animais de ninhada normal, indicando que o comportamento social de brincar pode ser influenciado pela diminuição do número de animais na prole.

Um estudo realizado por Moore *et al.* (2010) indica que alterações de hormônios, principalmente insulina, gerados pela supernutrição no início da vida pode alterar o comportamento lúdico de animais. Além disso, outro estudo relata que a redução desse tipo de comportamento, considerado normal para roedores nessa idade, pode estar relacionada a alterações no córtex pré-frontal dos animais (VAN KERKHOFF *et al.*, 2013).

Contudo, a diminuição de interações lúdicas encontradas chama atenção para o possível impacto da supernutrição no período inicial de desenvolvimento no comprometimento do neurodesenvolvimento e aparecimento de sintomas neuropsiquiátricos na infância.

Além da diminuição da interação, em nossos estudos os animais machos da ninhada reduzida apresentaram maior tempo de imobilidade no teste de nado forçado. O teste de nado forçado é um teste preditivo de comportamentos tipo depressivos em animais, que leva em consideração a relação do animal estar em uma situação de perigo e não ter o comportamento característico de fuga, mantendo-se imóvel, com movimentos suficientes apenas para manter a vida (YANKELEVITCH-YAHAV *et al.*, 2015).

Dessa forma, pode-se dizer que os animais machos de ninhada reduzida apresentaram comportamento tipo depressivo quando comparados com o de ninhada normal. Esse fato pode estar ligado à maior presença de tecido adiposo, devido à obesidade induzida pela supernutrição precoce.

Trabalho desenvolvido por Sharma e Fulton (2012) avaliou a relação da obesidade, desenvolvida em camundongos por protocolo de dieta hipercalórica, com comportamento tipo depressivo, através do teste de nado forçado encontrando maior tempo de imobilidade nos animais com obesidade induzida pela dieta hipercalórica quando comparado com os que receberam dieta normal.

Almeida-Suhett *et al.* (2017) também avaliaram a relação entre a obesidade induzida por dieta, neste caso, rica em gordura, com alterações comportamentais em camundongos machos de 17 semanas, indicando que o excesso de peso promovido pela dieta hipergordurosa alterou o comportamento dos animais, desenvolvendo comportamento tipo depressivo e ansioso, de acordo com os testes utilizados. Além disso, o trabalho indica uma relação entre a presença dessa obesidade com o

desenvolvimento de neuroinflamação devido a um aumento de proteínas neuroinflamatórias no hipocampo, sendo uma delas o GFAP.

Estudo realizado por Ambrósio *et al.* (2018) mostra a relação entre o estado inflamatório sistêmico gerado pela obesidade e o desenvolvimento de neuroinflamação e suas consequências em alterações neuroquímicas como disfunção do eixo HPA, alteração no metabolismo das monoaminas, alteração no metabolismo de glutamato e redução de neuroplasticidade e neurogênese, podendo estar relacionada a alterações comportamentais com o aparecimento de sintomas como fadiga e sintomas depressivos.

Nesse sentido, avaliar possíveis alterações no sistema nervoso central provocadas pela obesidade é de grande importância para elucidar a relação entre essa doença crônica e seus desfechos negativos. Dessa forma, a avaliação de parâmetros relacionados a alterações no sistema nervoso central é de grande importância para o desfecho dessas investigações.

Como citado anteriormente em relação à anatomia celular do sistema nervoso central, sabe-se que o mesmo é formado por células nervosas que são envolvidas por células da glia, as quais desempenham importante papel de sustentação e proteção dos neurônios (GUILLAMÓN-VIVANCOS; GÓMEZ-PINEDO; MATÍAS-GUIU, 2012).

O maior componente das células da glia são os astrócitos, os quais desempenham inúmeras funções no sistema nervoso central, em busca de manutenção da sua homeostase. Porém injúrias ou mediadores inflamatórios podem ser capazes de ativar essas células causando um aumento na quantidade das mesmas conhecido como astrogliose reativa, que pode ser identificada através da avaliação de um biomarcador clássico de astrócitos, a proteína GFAP (SOFRONIEW, 2013).

GFAP é usada como biomarcador de astrócitos, pois, é a proteína predominante nos astrócitos maduros que, como citado anteriormente, se altera devido a interferências no desenvolvimento ou no sistema nervoso central. A expressão de GFAP é regulada sob a influência de fatores neuronais e expressão de citocinas e/ou mediadores inflamatórios (MENARD; HODES; RUSSO, 2016; LI *et al.*, 2019)

Estudo feito por Kassubek *et al.* (2017) indica que a proteína GFAP é um biomarcador de inflamação aguda no cérebro de humanos com esclerose múltipla, reforçando a ligação do aumento de expressão de GFAP com neuroinflamação.

Para complementar a relação entre a presença aumentada de GFAP e fatores inflamatórios, estudo desenvolvido por Marina Pedro Seady (2018) mostrou que a utilização de compostos bioativos presentes em alimentos como piperina e curcumina são capazes de reverter um aumento de GFAP gerado por um fator inflamatório desencadeado pela presença de LSP (lipopolissacarídeo), reforçando a relação entre o aumento da expressão de GFAP e a neuroinflamação.

No presente estudo animais machos de ninhada reduzida apresentaram aumento da expressão da proteína GFAP no córtex pré-frontal. Como dito anteriormente, essa é uma proteína marcadora de astrócitos, que aumenta devido a alterações no sistema nervoso central, inflamação e outros fatores. Portanto, o aumento da expressão dessa proteína no córtex pré-frontal de ratos pré-púberes machos obesos pode estar relacionada à uma astrogliose, que é uma resposta astrocítica à interferentes ambientais, sendo que diversos interferentes ativam a expressão de GFAP de maneira diferente (LI *et al.*, 2019).

Guillamón-Vivancos, Gómez-Pinedo e Matías-Guiu (2012) indicam que a astrogliose reativa, quando na forma moderada ou grave, gera um aumento na expressão da proteína GFAP, como observado no presente estudo.

Nesse sentido, é importante ressaltar que o tecido adiposo é caracterizado por um infiltrado linfocitário difuso no qual os macrófagos do tecido adiposo estão aumentados em número e predispostos a um fenótipo inflamatório na obesidade, sendo fonte dominante de muitas citocinas inflamatórias, cuja expressão é alterada na obesidade, incluindo níveis teciduais elevados de TNF- α , IL-6, IL-1 e CCL-2 (DE JESUS PINTO, 2014; LACERDA; MALHEIROS; ABREU, 2016).

O processo de inflamação pode ser iniciado por um trauma mecânico, resposta autoimune ou inflamação sistêmica. Estudos indicam que a inflamação sistêmica tem um papel importante no desenvolvimento e progresso de quadros patológicos que envolvem o sistema nervoso central e complementando essa informação, Miller e Spancer (2014) relacionaram a obesidade com o desenvolvimento de neuroinflamação e prejuízo cognitivo.

A obesidade e seu característico processo inflamatório leva, portanto, a uma ativação dos astrócitos, visto no presente estudo pela expressão aumentada da proteína GFAP, levando à diversos mecanismos de defesa no sistema nervoso central, os quais podem atingir diferentes níveis, causando diversas consequências.

Sendo que essa hiperativação dos astrócitos pode interferir nas sinapses e processos neurais gerando desde consequências sutis até as mais complexas (TAO *et al.*, 2011).

Isso, pois, o aumento intensificado da atividade dos astrócitos, em busca de proteção ao sistema nervoso central, pode levar à alterações em neurotransmissores, bloqueio do crescimento de axônios, pela formação de uma espécie de cicatriz glial, aumento da expressão de mediadores inflamatórios, prostaglandinas, óxido nítrico, entre outras, causando efeitos nas sinapses e estruturas neurais, acarretando no aparecimento de alterações comportamentais, tais como, comportamento doentio, retração de interação, redução de exploração, queda no apetite, alteração de cognição, distúrbios no sono, transtorno de humor, transtorno depressivo e dor (SOFRONIEW, 2013).

Nesse sentido, a correlação positiva encontrada entre o aumento da expressão da proteína GFAP no córtex pré-frontal dos animais machos de ninhada reduzida com o peso do animal e a quantidade de tecido adiposo reforça a relação entre o excesso de peso corporal e tecido adiposo, os quais caracterizam obesidade, e o desenvolvimento de neuroinflamação, responsável pela reação exacerbada dos astrócitos, a astrogliose reativa, em busca de proteção do sistema nervoso central.

Como dito anteriormente, a astrogliose inicia-se como forma de proteção ao sistema nervoso central, porém, ao passo em que essa reação se torna mais efetiva há a perda da homeostase, acompanhada de disfunção de sinapses e estruturas neurais, responsáveis por diversas alterações no sistema nervoso central (SOFRONIEW, 2013).

Sobre essas alterações que podem ocorrer no sistema nervoso central, as consequências comportamentais vêm sendo mostradas por Sofroniew, Michael V. (2013) relacionando a astrogliose com o desenvolvimento de diversos sintomas comportamentais, inclusive depressivos. Mostramos, através da correlação positiva entre a porcentagem de expressão da proteína GFAP no córtex pré-frontal e o aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado, o qual caracteriza sintomas tipo depressivos, que a astrogliose gerada pela obesidade precoce é capaz de desencadear sintomas tipo depressivos no animal macho ainda na fase pré-púbere.

Portanto, no presente trabalho observou-se então que há correlação entre o peso corporal e tecido adiposo aumentados com o aumento da expressão de GFAP no córtex pré-frontal e que o aumento da porcentagem de expressão da proteína

GFAP tem grande correlação com o desenvolvimento de sintomas tipo depressivos o que mostra a influência do peso e tecido adiposo no consequente desenvolvimento de astrogliose reativa, caracterizada pelo biomarcador GFAP, e sintomas tipo depressivos em machos de maneira precoce.

O dimorfismo sexual encontrado neste estudo mostra uma possível proteção contra à neuroinflamação ou mesmo a não exacerbação da mesma no cérebro das fêmeas frente à insultos inflamatórios gerados pela presença de tecido adiposo. Neste sentido, estudo desenvolvido por Lenz e McCarthy (2014) mostra uma maior quantidade de micróglia no cérebro de animais machos, o que pode estar relacionado à esta exacerbação da neuro inflamação vista nos animais machos.

Assim, mais estudos são necessários para esclarecer os motivos desse dimorfismo sexual observado em relação à neuro inflamação nos animais machos.

Assim, pode-se dizer que a obesidade pré-púbere induzida pela supernutrição na redução de ninhada está relacionada à diminuição da interação dos animais em ambos os sexos e aparecimento de comportamento tipo depressivo nos animais machos, acompanhado do aumento na expressão de GFAP, possivelmente, por uma astrogliose reativa desencadeada pela obesidade. Vale ressaltar que essas alterações comportamentais não foram causadas por negligência materna, pois, as mães apresentaram aumento de comportamento materno e diminuição do comportamento não materno e que às alterações comportamentais não estão ligadas à dificuldade de locomoção, pois, não houve alteração na locomoção dos mesmos.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que a redução de ninhada foi capaz de induzir o excesso de peso no período pré-púbere contribuindo para o desenvolvimento de sintomas tipo-depressivos. Estes sintomas foram mais acentuados em machos possivelmente por apresentarem astrogliose, caracterizada pela maior expressão de GFAP no córtex pré-frontal.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA. **Mapa da obesidade**. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>. Acesso em: 20 dez. 2020.
- ALMEIDA-SUHETT, C. P. *et al.* Behavioral changes in male mice fed a high-fat diet are associated with IL-1 β expression in specific brain regions. **Physiology & Behavior**, v.169, p.130–140, 2017.
- AMBRÓSIO, G. *et al.* Depression and peripheral inflammatory profile of patients with obesity. **Accepted Manuscript**,. v. 17, p. 31279-31289, 2018.
- ÁVILA, M. A. P. *et al.* Prenatal exposure to alcohol impairs social play behavior in adolescent male mice. **Neurotoxicology**, v.79, p.142–149, 2020.
- AZEVEDO, F. R.; BRITO, C. B. Influência das variáveis nutricionais e da obesidade sobre a saúde e o metabolismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 58, n. 6, p. 714-723, 2012.
- BELAVER, B. **Análise ontogenética de culturas de astrócitos hipocampais**. 2013. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS, 2013.
- BESSESEN, Daniel H. Update on obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 6, p. 2027–2034, 2008.
- BOGOSLOVSKY, T. *et al.* Increases of plasma levels of glial fibrillary acidic protein, tau, and amyloid b up to 90 days after traumatic brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 1, n. 8, 2016.
- BORSINI, A. *et al.* The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. **Trends in Neurosciences**, n. 3, v. 38, p. 1–13, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Vigilância Alimentar e Nutricional. **Curvas de crescimento da organização Mundial da Saúde-OMS**, Brasília, 2022. Disponível em: <https://aps.saude.gov.br/ape/vigilanciaalimentar/curvascrescimento>. Acesso em: 20 dez. 2020.
- BRENNER, M.; MESSING, A. Regulation of GFAP expression. **ASN Neuro.**, v. 13, p.1–32, 2021.
- BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Front Neuroendocrinol**, v. 36, p. 178-96, 2015.
- CABALLERO, B. Humans against obesity: who will win?. **Adv Nutr**, v. 10, p. S4–S9, 2019.

- CALDERARO, R. S. S.; CARVALHO, C. V. Depressão na infância: um estudo exploratório. **Psicologia em Estudo**, Maringá, v. 10, n. 2, p. 181-189, 2005.
- CANALE, A.; FURLAN, M. M. D. P. Depressão. **Arq Mudi.**, v. 10, n. 2, p. 23-31, 2006.
- CARVALHO, A. L. O. *et al.* Early life overnutrition induced by litter size manipulation decreases social play behavior in adolescent male rats. **Int. J. Devl Neuroscience**, v. 53, p. 75–82, 2016.
- CIGARROA, I. *et al.* A intervenção na esteira atenua o comprometimento induzido pela dieta da cafeteria das estratégias de enfrentamento do estresse em ratas adultas jovens. **PLoS One**, v. 11, n. 4, 2016.
- CODONER-FRANCH, P. *et al.* Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. **Translational Research**, n. 6, v. 158, p. 369-384, 2014.
- CODONER-FRANCH, P. *et al.* Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. **Translational Research.**, v. 158, n. 6, 2011.
- CRUVINEL, M.; BORUCHOVITCH, E. Depressão infantil: uma contribuição para a prática educacional. **Psicologia Escolar e Educacional**, v. 7, n.1, p. 77-84, 2003.
- CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 29, n. 4-5, p. 547-569, 2005.
- CUNHA, A. C. S. R. *et al.* Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion — the role of GLUT-2. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 435–442, 2009.
- DANTZER, R. *et al.* From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat Rev Neurosci**. v. 9, n. 1, p. 46–56, 2008.
- DE JESUS PINTO, W. A função endócrina do tecido adiposo. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 16, n. 3, p. 111-120, 2014.
- DEBARBA LK. **Efeitos da programação nutricional neonatal em células da glia hipotalâmica em ratos juvenis e adultos**. 2017. 197f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2017.
- DIETZ, W. H. Obesity. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 8, n. 1, p.13S-21S, 1989.
- EKNOYAN, G. A history of obesity, or how what was good became ugly and then bad. **Adv Chronic Kidney Dis.**, v. 13, n. 4, p. 421–427, 2016.

ENES-MARQUES, S.; GIUSTI-PAIVA, A. Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 68, n.6, p. 789–798, 2018.

ENES-MARQUES, S. *et al.* Neonatal overnutrition programming impairs cholecystokinin effects in adult male rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 86, p. 1084-1094, 2020.

ESPERIDIÃO-ANTONIO, V. *et al.* Neurobiologia das emoções. **Revista de Psiquiatria Clínica**, n. 2, v. 35, p. 55-65, 2008.

FAITH, M. S. *et al.* Evidence for prospective associations among depression and obesity in population-based studies. **Obesity Reviews**, v. 12, p. 438–453, 2011.

GALLAND, Fabiana Andrea Barrera. **Caracterização funcional de modelos de cultura de astrócitos e mecanismo de internalização da proteína S100b**. 2017. 164 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS, 2017.

GLUCKMAN P. D.; HANSON, M. A.; BEEDLE, S. D. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. **American Journal Of Human Biology**, v. 19, p. 1-19, 2007.

GIBSON-SMITH, D. *et al.* Childhood overweight and obesity and the risk of depression across the lifespan. **BMC Pediatrics**, n. 20, v. 25, p. 20-25, 2020.

GORAYEB, A. M. A. G. L. R.; LIBERATORI - JUNIOR, R. D. R.; DOMINGUES, N. A. M. Depressão, ansiedade, competência social e problemas comportamentais em crianças obesas. **Estudos de Psicologia**, v. 10, n. 3, p. 371-375, 2005.

GUILLAMÓN-VIVANCOS, T.; GÓMEZ-PINEDOA, U.; MATÍAS-GUIU, J. Astrocytes en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. **Neurología**, n. 2 v. 30, p. 119-129, 2013.

HABBOU A. *et al.* Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. **J Nutr**, v. 143, n. 5, p. 553-562, 2013.

HAGER, A. Adipose tissue cellularity in childhood in relation to the development of obesity. **British Medical Bulletin**, v. 37, n. 3, p. 287-290, 1981.

HOLST, C. B. *et al.* Astroglialogenesis in human fetal brain: complex spatiotemporal immunoreactivity patterns of GFAP, S100, AQP4 and YKL-40. **J. Anat.**, n. 3, v. 235, p. 590-615, 2019.

HUTTEL, J. *et al.* Infantile depression and its ways of manifestation. **Psicol. Argum.**, n. 29, v. 64, p. 11-22, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 – POF**. Rio de Janeiro, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional por amostra de domicílios**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/4699#resultado>:. Acesso em: 20 dez. 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saúde**. Rio de Janeiro, 2019.

KAFFMAN, A.; MEANEY, M. J. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 48, n. 3/4, p. 224–244, 2017.

KASSUBEK, R. *et al.* GFAP in early multiple sclerosis: a biomarker for inflammation. **Neuroscience Letters**, v. 657, p. 166-170, 2017.

KIRKEDAL, C. *et al.* A dual inhibitor of FAAH and TRPV1 channels shows dose-dependent effect on depression-like behaviour in rats. **Acta Neuropsychiatr.**, v. 12, p. 1-6, 2017.

KUBERA, M. *et al.* In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 744–759, 2011.

LACERDA, M. S.; MALHEIROS, G. C.; DE ABREU, A. D. O. W. Tecido adiposo, uma nova visão: as adipocinas e seu papel endócrino. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 11, n. 2, p. 25-31, 2016.

LENZ, K. M.; MCCARTHY, M. M. A Starring role for microglia in brain sex differences. **The Neuroscientist**, n. 3, v. 21, p. 1–16, 2014.

LEVIN, B. E. The obesity epidemic: metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits. **Obesity Research**, v. 8, n. 4, 2000.

LI, D. *et al.* Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. **Glia**, n. 5, v. 68, p.1–20, 2019.

MAIA, F. T. S. **Determinação de alterações comportamentais e neuroquímicas do aprepitante no modelo crônico de depressão induzido pela administração repetida de lipopolissacarídeo em camundongos**. 2017. 131 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2017.

MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Rev. Neurosci.**, v. 24, p. 1161–192, 2001.

MELANCIA, F.; TREZZA, V. Modelling fragile X syndrome in the laboratory setting: a behavioral perspective. **Behav Brain Res.**, v. 350, p. 149-163, 2018.

MELO, Luciane Rodrigues Bandeira. **Memória de trabalho e função executiva – uma proposta de diálogo entre dois modelos teóricos**. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Psicologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2011.

MENARD, C.; HODES, G. E.; RUSSO, S. J. Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies. **Neuroscience**, v. 3, n. 321, p. 138–162, 2016.

MILANO, W. *et al.* Depression and obesity: analysis of common biomarkers. **Diseases**, v. 8, n. 23, p. 2-19, 2020.

MILLER, A. A.; SPENCER, S. J. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. **Brain Behav Immun**, v. 42, p. 10-21, 2014.

MOORE, H. *et al.* Moderate recurrent hypoglycemia during early development leads to persistent changes in affective behavior in the rat. **Brain Behav Immun.**, v. 24, n. 5, p. 839–849, 2010.

MOZES, S.; SEFČÍKOVÁ, Z.; RAČEK, L. Effect of repeated fasting/refeeding on obesity development and health complications in rats arising from reduced nest. **Dig Dis Sci**, v. 60, n. 2, p. 354-361, 2015.

NOLDUS, L. P. J. J.; SPINK, A. J.; TEGELENBOSCH, R. A. J. EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behavior Research Methods, Instruments & Computers**, v. 33, n. 3, p. 398-414, 2001.

NOVAIS, Cintia Onofra. **Obesidade materna por redução de ninhada induz comportamento tipo autista na prole**. 2020. 81f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2020.

NOVAIS, C. O. *et al.* Maternal overweight induced by reduced litter size impairs the behavioral neurodevelopment of offspring. **Life Sciences**, v. 277, p. 1196-1211, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Integração da saúde mental nos cuidados de saúde primários: uma perspectiva global**. Brasília, 2008.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Depressão**. [S.l.], 2020. Disponível em <https://www.paho.org/pt/topicos/depressao#:~:text=Em%20todo%20o%20mundo%2C%20esima,s%C3%A3o%20mais%20afetadas%20que%20homens>. Acesso em: 20 jul. 2022.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. **J Nutr**, v. 140, n. 3, p. 658-66, 2010.

- PATEL, J. J. *et al.* The critical care obesity paradox and Implications for nutrition support. **Curr Gastroenterol Rep**, n. 9, v. 18, p. 18-45, 2016.
- PIETROBELLI, A.; ESPINOZA, M. C.; CRISTOFARO, P. Childhood obesity: looking Into the Future. **Angiology**, v. 59, p. 30S-33S, 2008.
- PLAGEMANN, A. *et al.* Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. **J. Perinat. Med.**, v. 38, p. 393–400, 2010.
- PORSOLT, R. D. *et al.* Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, n. 4, v. 47, p. 379-391, 1978.
- REINEHR, T.; WABITSCH, M. Childhood obesity. **Current Opinion in Lipidology**, v. 22, p. 21–25, 2011.
- RIBEIRO, A. C. A. F. *et al.* Metabolic syndrome accentuates post-traumatic stress disorder-like symptoms and glial activation. **Behavioural Brain Research**, v. 384, p. 1125-11257, 2020.
- RIBEIRO, A. C. A. F. *et al.* Cafeteria diet during the gestation period programs developmental and behavioral courses in the offspring. **Int J Dev Neurosci**, v. 68, p. 45-52, 2018.
- RODRIGUES, A. L. *et al.* Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 109–117, 2011.
- RODRIGUES, A. L. *et al.* Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. **Journal of Endocrinology**, v. 195, p. 485–494, 2007.
- ROZENTHAL, M.; LAKS, J.; ENGELHARDT, E. Aspectos neuropsicológicos da depressão. **Revista de Psiquiatria**, n. 2, v. 26, p. 204-212, 2004.
- RYAN, V.; WEHMER, F. Effect of postnatal litter size on adult aggression in the laboratory mouse. **Developmental Psychobiology**, v. 8, n. 4, p. 363-370, 1975.
- SALARI, A. A. *et al.* Small litter size impairs spatial memory and increases anxiety like behavior in a strain-dependent manner in male mice. **Scientific Reports**, v. 8, p. 11281-11293, 2018.
- SCHMIDT, I. *et al.* The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v. 25, n. 8, p. 1168-74, 2001.

SEADY, Marina Pedra. **Efeito da curcumina e piperina, compostos presente no curry, em cultura primária de astrócitos de ratos wistar em condições normais ou inflamatórias**. 2018. 54 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS, 2018.

SHARMA, S.; FULTON, S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. **International Journal of Obesity**, n. 3, v. 37, p. 1 – 8, 2012.

SHASHATY, M. G. S.; STAPLETON, R. D. Physiological and management implications of obesity in critical illness. **Ann Am Thorac Soc.**, v. 11, n. 8, p. 1286–1297, 2014.

SOMMER, A.; TWIG, G. The Impact of childhood and adolescent obesity on cardiovascular risk in adulthood: a systematic review. **Current Diabetes Reports**, n. 10, v. 18, p. 18, 2018.

SOFRONIEW, M. V. Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. **The Neuroscientist**, n. 2, v. 20, p. 1-13, 2013.

SOUZA, S.; RODRIGUES, T. M. Depressão infantil: considerações para professores da educação básica. **Braz. J. of Develop.**, v. 6, n. 6, p. 34326-34338, 2020.

TAO, J. *et al.* Deletion of astroglial dicer causes non-cell-autonomous neuronal dysfunction and degeneration. **J Neurosci**. v. 31, n. 22, p. 8306–19, 2011.

TERRANOVA, M. L.; LAVIOLA, G.; ALLEVA, E. Ontogeny of amicable social behavior in the mouse: gender differences and ongoing isolation outcomes. **Dev. Psychobiol**. v. 26, n. 8, p. 467–481, 1993.

TREZZA, V.; BAARENDSE, P. J.; VANDERSCHUREN, L. J. Prosocial effects of nicotine and ethanol in adolescent rats through partially dissociable neurobehavioral mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 12, p. 2560-2573, 2009.

TREZZA, V.; VANDERSCHUREN, L. J. Bidirectional cannabinoid modulation of social behavior in adolescent rats. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 2, p. 217- 227, 2008.

VAN KERKHOF, L. W. *et al.* Cellular activation in limbic brain systems during social play behaviour in rats, **Brain Struct. Funct.**, n. 4, v. 219, p. 1181–1211, 2013.

VAN KERKHOF, L.W. *et al.* Social play behavior in adolescent rats is mediated by functional activity in medial prefrontal cortex and striatum. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 10, p. 1899–1909, 2013.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J. *et al.* The neurobiology of social play behavior in rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 3, p. 309-326, 1997.

- VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P.; SPEAR, N. E. Social behavior and social motivation in adolescent rats: role of housing conditions and partner's activity. **Physiol. Behav.** v. 67, n. 4, p. 475–482, 1999.
- VERDE, S. M. M. L. Obesidade infantil: o problema de saúde pública do século 21. **Rev Bras Promoç Saúde**, Fortaleza, n. 1, v. 27, p. 1-2, 2014.
- VERONESI, V. B. **Influência da dipirona sódica sobre as respostas comportamentais em camundongos fêmeas lactantes e a repercussão nos filhotes adolescentes.** 2016. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas – MG, 2016.
- VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. **Endocrinology**, v. 152, n. 12, p. 4838-45, 2011.
- VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Behav Brain Res**, v. 263, p. 190-197, 2014.
- VILELA, F. C.; SONCINI, R.; GIUSTI-PAIVA, A. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **J Ethnopharmacol.**, v. 124, n. 2, p. 325-327, 2009.
- VITOR-VIEIRA, F.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Hyperactivation of the amygdala correlates with impaired social play behavior of prepubertal male rats in a maternal immune activation model. **Behavioural Brain Research**, v. 414, p. 113503, 2021.
- WADDEN, T. A.; BROWNELL, K. D.; FOSTER, G. D. Obesity: responding to the global epidemic. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 70, n. 3, p. 510–525, 2002.
- WANG, S. *et al.* The prevalence of depression and anxiety symptoms among overweight/obese and non-overweight/ non-obese children/adolescents in China: a systematic review and meta-analysis. **Res. Public Health**, v. 16, p. 340-147, 2019.
- YANKELEVITCH-YAHAV, R. *et al.* The forced swim test as a model of depressive-like behavior. **J. Vis. Exp.** v.97, 2015.
- ZWIRNER, J. *et al.* GFAP positivity in neurons following traumatic brain injuries. **International Journal of Legal Medicine**, v. 135, p. 2323–2333, 2021.

ANEXO

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Lei nº 11.124, de 28 de julho de 2008

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Influência da obesidade precoce induzida por redução de ninhada no desenvolvimento dos sintomas semelhantes ao TEPT e possíveis implicações neurogênicas**, registrada com o nº 0036/2021, sob a responsabilidade de Alexandre Giusti Paiva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, com vigência de 07/08/2021 a 07/09/2025, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Rato / Wistar	30	10	20	Biotério central

Alfenas, 26 de Agosto de 2021

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse <http://ceuas.unifal-mg.edu.br/portal/ceuas/autenticidade/comissao/> e digite o chave de acesso de:01740190264138962a761e04b0d7