

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Neurociências

Alessandra Rocha Job

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO TIPO 2 DE NEUROMEDINA U
NO HIPOTÁLAMO EM MODELO MURINO DE CICLAGEM DE PESO E
COMPULSÃO ALIMENTAR**

Vitória

2022

Alessandra Rocha Job

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO TIPO 2 DE NEUROMEDINA U
NO HIPOTÁLAMO EM MODELO MURINO DE CICLAGEM DE PESO E
COMPULSÃO ALIMENTAR**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Martins e Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Luciene Bruno Vieira

Vitória

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

043

Job, Alessandra Rocha.

Avaliação da expressão do receptor do tipo 2 de Neuromedina U no hipotálamo em modelo murino de ciclagem de peso e compulsão alimentar [manuscrito] / Alessandra Rocha Job. – 2022.

79 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristina Martins e Silva. Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Luciene Bruno Vieira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Transtorno da Compulsão Alimentar. 3. Neuropeptídeos. 4. Ganho de Peso. 5. Perda de Peso. I. Silva, Cristina Martins e. II. Vieira, Luciene Bruno. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO TIPO 2 DE NEUROMEDINA U NO HIPOTÁLAMO EM MODELO MURINO DE CICLAGEM DE PESO E COMPULSÃO ALIMENTAR

ALESSANDRA ROCHA JOB

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS BÁSICAS.

Aprovada em 24 de março de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Camyla Rocha de Carvalho Guedine

UFAC

Prof(a). Grace Schenatto Pereira Moraes

UFMG

Prof(a). Luciene Bruno Vieira - Coorientadora

UFMG

Prof(a). Cristina Martins e Silva - Orientadora

UFES

Belo Horizonte, 24 de março de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Martins e Silva, Usuário Externo**, em 25/03/2022, às 08:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?

07/04/2022 16:29

SEI/UFMG - 1307608 - Folha de Aprovação



[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](#), informando o código verificador **1307608** e o código CRC **EA66D6D9**.

Referência: Processo nº 23072.213680/2022-03

SEI nº 1307608

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que me iluminou em momentos de dificuldades e incertezas.

À minha orientadora, prof.^a Dr.^a Cristina Martins Silva, pela confiança depositada em mim desde o meu ingresso no laboratório, pelos conhecimentos adquiridos, por seus ensinamentos e pela paciência e disponibilidade concedidas durante três anos de convivência.

À minha coorientadora, Dr.^a Luciene Bruno Vieira, por facilitar o desenvolvimento dos meus experimentos, disponibilizando equipamentos e pelas valiosas dicas que contribuíram com o meu trabalho.

Aos colegas do laboratório LabNEC, que contribuíram para o sucesso deste trabalho e pelos bons e inesquecíveis momentos vividos.

À Roberta dos Santos Ribeiro do NEUROFAR pela disposição, atenção e auxílio, todos os ensinamentos mesmo a distância.

À Tamara Alarcon Ferreira do LMNC pela disponibilidade e parceria fundamental para realização deste trabalho.

Às minhas filhas, que muito me apoiaram durante o desenvolvimento deste trabalho e entenderam vários momentos de ausência durante a construção deste sonho.

RESUMO

A ciclagem de peso é um termo utilizado para designar o perfil de perda e ganho de peso advindo de dietas restritivas, capaz de trazer prejuízos para a saúde, além do desenvolvimento de transtornos alimentares. Dentre tais transtornos, podemos destacar o Transtorno de Compulsão Alimentar (TCA), responsável por afetar cerca de 3,5% das mulheres e 2% dos homens. A origem do TCA é multifatorial e sua neurobiologia ainda não está completamente elucidada, entretanto evidências recentes apontam a sinalização através do neuropeptídeo Neuromedina U como um possível mecanismo para o TCA. A deficiência do receptor de Neuromedina U do tipo 2 (NMUR2) no hipotálamo de camundongos levaria a uma maior ingestão de alimentos hiperpalatáveis. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar se camundongos submetidos a diferentes dietas, estimulantes de ciclagem de peso e/ou compulsão alimentar, apresentam alterações comportamentais do tipo ansioso e compulsivo, e se essas alterações têm relação com os níveis proteicos de NMUR2 no hipotálamo. Para tal, camundongos machos C57BL/6J adultos foram divididos em quatro grupos e submetidos a quatro diferentes tipos de dieta alimentar por um período de 6 semanas. O protocolo para restrição calórica consistiu em ofertar 60% da quantidade habitual de ração comercial. Para a indução do TCA, a dieta hiperpalatável com biscoito Oreo foi utilizada. O grupo dieta compulsão 1 (CP1) recebeu o Oreo juntamente com a ração padrão, alternando com semanas de restrição calórica. O grupo dieta compulsão 2 (CP2) recebeu ração padrão alternando com semanas de restrição calórica. O grupo dieta compulsão alimentar (CA) recebeu ração padrão juntamente com o Oreo semanalmente. Já o grupo controle (CTRL) recebeu apenas dieta padrão. Assim, o estudo avaliou se as dietas eram capazes de alterar o consumo alimentar, induzir ciclagem de peso e/ou compulsão alimentar, além de desenvolver comportamento do tipo ansioso/compulsivo, que foi avaliado pelos testes de labirinto em cruz elevado (LCE) e "marble burying". Nossos resultados apontam que os animais dos grupos CP1 e CP2 apresentaram ciclagem de peso ao longo dos ciclos, bem como ingeriram mais calorias ao final do tratamento. A eficiência alimentar foi calculada e observou-se que a ciclagem de peso foi capaz de diminuir essa eficiência. Contudo o oposto foi observado quando não houve ciclagem. Os grupos analisados apresentaram alteração no tempo despendido nos braços abertos no teste LCE, porém o grupo CP1 permaneceu maior tempo nos braços fechados. O teste "marble burying" demonstrou que CP1 e CA enterraram estatisticamente mais bolinhas nos 10 primeiros minutos de teste quando comparados aos demais grupos. Após eutanásia dos grupos estudados, a quantidade proteica de NMUR2 no hipotálamo foi medida por western blot. Entretanto, nenhuma diferença estatística foi observada. O estudo, portanto, sugere que a ciclagem de peso está associada com aumento do consumo calórico, diminuição da eficiência alimentar, e aumento do comportamento tipo ansioso, porém sem alterações significativas na quantidade proteica de NMUR2 no hipotálamo.

Palavras-Chave: Ciclagem de Peso. Transtorno da Compulsão Alimentar. NMUR2.

ABSTRACT

Weight cycling is a term used for the profile of weight loss and gain resulting from restrictive diets that can harm health in addition to the development of eating disorders. One of these disorders is binge eating (BED) which affects about 3.5% of women and 2% of men. The development of TCA is multifactorial and its neurobiology is not yet fully elucidated, however recent evidence points to the participation of the neuropeptide Neuromedin U and its receptors. Neuromedin U receptor type 2 (NMUR2) deficiency in the mouse hypothalamus leads to a higher intake of hyper palatable foods. The aim of this study was to verify whether mice submitted to different diets that can stimulate weight cycling and/or binge eating cause changes in anxiety and compulsion-like behaviors, correlating with NMUR2 protein abundance in the hypothalamus. Adult male C57BL/6J mice were divided into four groups and submitted to 4 different types of diet for a period of 6 weeks. Caloric restriction consisted of offering 60% of the usual amount of commercial food and the Oreo cookie was used as a hyper palatable food. The diet binge 1 (CP1) group received the Oreo along with the standard chow, alternating with weeks of calorie restriction. The diet binge 2 (CP2) group received standard chow alternating with weeks of calorie restriction. The binge eating (CA) group received standard chow along with Oreo weekly. The control group (CTRL) received standard diet only. The study evaluated whether the diets altered food consumption, induced weight cycling and/or binge eating, in addition to the development of anxious/compulsive behavior by the elevated plus maze (LCE) and "marble burying" tests. The results indicate that CP1 and CP2 presented weight cycling during the cycles and that the calories ingested at the end of the treatment were statistically superior to the other groups. Feed efficiency was calculated and it was observed that weight cycling decreases this efficiency, the opposite being observed when there was no cycling. The groups showed changes in the time spent in the open arms in the LCE test, but the CP1 group remained statistically longer in the closed arms. The marble burying test showed that CP1 and CA buried statistically more marbles in the first 10 minutes of the test when compared to the other groups. The protein levels of NMUR2 in the hypothalamus did not show statistical differences between the groups. The study, therefore, suggests that weight cycling is associated with increased caloric intake, decreased feed efficiency, anxious-like behavior pattern, but without significant changes in NMUR2 protein abundance in the hypothalamus.

Keywords: Weight Cycling. Binge Eating Disorder. NMUR2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Controle do equilíbrio energético pelos dois tipos de neurônios do núcleo arqueado: (1) neurônios pró-opiomelanocortina (POMC) que liberam o hormônio estimulante de a-melanócito (α-MSH) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), reduzindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético e (2) neurônios que produzem a proteína relacionada à agouti (AGRP) e o neuropeptídeo Y (NPY), aumentando a ingestão alimentar e reduzindo o gasto energético. O AGRP atua como um antagonista do MCR-4. Insulina, leptina e colecistocinina (CCK) são hormônios que inibem os neurônios AGRP-NPY e estimulam os neurônios POMC- CART adjacentes, reduzindo assim a ingestão alimentar. A grelina, um hormônio secretado pelo estômago, ativa os neurônios AGRP-NPY, estimulando a ingestão de alimentos (GUYTON, 2007).....	19
Figura 2 – Regulação da homeostase energética no SNC.....	21
Figura 3 – Integração de insumos homeostáticos relacionados à recompensa	23
Figura 4 – Representação esquemática das principais estruturas cerebrais implicadas em processos hedônicos e homeostáticos	24
Figura 5 – Circuito da Impulsividade e Compulsividade	30
Figura 6 – Desenho esquemático exemplificando a ação do NMU nos tecidos periféricos e no SNC	32
Figura 7 – Delineamento de grupo experimental	37
Figura 8 – Delineamento grupos experimentais	39
Figura 9 – Delineamento experimental ciclos alimentares CTRL	40
Figura 10 – Delineamento experimental ciclos alimentares grupo CP1	41
Figura 11 – Delineamento experimental ciclos alimentares grupo CP2	41
Figura 12 – Delineamento experimental ciclos alimentares CA	42
Figura 13 - Representação do Labirinto Cruz Elevado	44
Figura 14 – Representação do protocolo <i>Marble Burying</i>	45
Figura 15 – Fotografia do protocolo <i>Marble Burying</i>	45
Figura 16 – Fotografia dissecação hipotálamo	47
Figura 17 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre o peso do inicial vs o final (painel A) e, ganho de peso em gramas (painel B)	

e em porcentagem (painel C). CTRL (n=15), CP1 (n=15), CP2 (n=15) e CA (n=16), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguidas do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média ± erro padrão da média. ***p<0,001; ****p<0,0001 49

Figura 18 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre o ganho de peso do animal em gramas. CTRL (n=15), CP1 (n=15), CP2 (n=15) e CA (n=16), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguidas do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média ± erro padrão da média. #diferença entre os grupos que ciclaram o peso com os sem ciclagem. * diferença entre o grupo CP1 e CP2 50

Figura 19 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre o consumo de ração (painel A) e consumo de oreo (painel B). CTRL (n=15), CP1 (n=15), CP2 (n=15) e CA (n=16), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguidas do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média ± erro padrão da média. ns:sem diferença estatística entre os grupos CP1 e CP2. ***p<0,001 51

Figura 20 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre o consumo inicial e final em Kcal. CTRL (n=15), CP1 (n=15), CP2 (n=15) e CA (n=16), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguidas do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média ± erro padrão da média. # diferente do controle e CA; & diferente do CP1; ****p<0,0001 52

Figura 21 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre a eficiência alimentar. CTRL (n=15), CP1 (n=15), CP2 (n=15) e CA (n=16), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguidas do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média ± erro padrão da média. # diferente do controle e CA; ## diferente do controle; & diferente do CP1; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 53

Figura 22 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre o tempo de exploração no labirinto em cruz elevado. O painel A e painel B representam o tempo de exploração dos braços abertos e fechados, respectivamente. CTRL (n=12), CP1 (n=13), CP2 (n=11) e CA (n=13), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguidas do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média ± erro padrão da média. *p=0,0408 54

Figura 23 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre o número de bolinhas enterradas no teste de *Marble Burying*. O número total de esferas enterradas foi avaliado durante 30 minutos, sendo este tempo dividido em blocos de 10 minutos, como mostrados no painel A, B e C, respectivamente. CTRL (n=10-15), CP1 (n=15), CP2 (n=15) e CA (n=16), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média ± erro padrão da média. **p<0,001 55

Figura 24 – Efeito da ciclagem de peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre níveis proteicos de NMUR2 hipotalâmica (A) Imagens representativas d NMUR2 e proteína da beta actina que foi utilizada como normalizador de carregamento. (B) Quantificação da densidade óptica das imagens do NMUR2 em relação a proteína constitutiva. As barras do gráfico representam a média \pm erro padrão da média; n= 5 por grupo56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da ração padrão	38
--	----

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACH – Acetilcolina

ACC – Córtex Cingulado Anterior

AgRP – Proteína Relacionada Agouti

AN – Anorexia Nervosa

ARC – Núcleo Arqueado do Hipotálamo

BN – Bulimia Nervosa

CA – Grupo Compulsão Alimentar

CART – Transcrito relacionado à cocaína e anfetamina

CCK – Colecistoquinina

CEUA – Comitê de Ética Animal

COF – Córtex Orbito Frontal

CT – Colesterol Total

CTRL – Grupo Controle

CP1 – Grupo Ciclagem de Peso 1

CP2 – Grupo Ciclagem de Peso 2

DA – Dopamina

DMH – Hipotálamo Dorsomedial

EV – Estriado Ventral

GABA – ácido gama-aminobutírico

GH – Hormônio do Crescimento

GHR – Receptor de GH

GLP-1 – Peptídeo Semelhante ao Glucagon 1

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HL – Hipotálamo Lateral

HOMA-IR – Pressão arterial e sensibilidade à insulina

HPA – Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

IMC – Índice de Massa Corporal

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LH – Hipotálamo Lateral

LHA – Área Hipotalâmica Lateral

NAc – Núcleo Accumbens

NMU – Neuromedina U

NMUR1 – Receptor 1 de Neuromedina

NMUR2 – Receptor 2 de Neuromedina

NPY – Neuropeptídeo Y

OMS – Organização Mundial da Saúde

PFC – Córtex Pré Frontal

POMC – Pró-opiomelanocortina

PVN – Núcleo Paraventricular

PYY – Peptídeo YY

SCN – Núcleo Supraquiasmático

SNC – Sistema Nervoso Central

TCA – Transtorno da Compulsão Alimentar

TGL – Triglicerídeos

VMH – Hipotálamo Ventromedial

VTA – Área Tegumentar Ventral

mPFC – Córtex pré-frontal medial

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Obesidade: conceito e aspectos gerais	16
1.2 Neurobiologia do Comportamento Alimentar	18
1.2.1 Aspectos gerais e circuitos que regulam os comportamentos alimentares.....	18
1.3 Ciclagem de Peso	25
1.4 Transtorno da Compulsão Alimentar TCA)	27
1.5 Receptor 2 de NMU	30
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Animais Experimentais	36
4.2 Delineamento Experimental	36
4.2.1 <i>Tipos de dietas</i>	37
4.2.1.1 Dieta controle.....	37
4.2.1.2 Dieta com restrição calórica.....	38
4.2.1.3 Dieta para indução de compulsão alimentar.....	38
4.3 Delineamento de Grupos Experimentais	39
4.3.1 <i>Grupo Controle</i>	39
4.3.2 <i>Grupo Ciclagem de Peso 1 (CP1) – Modelo Restrição e Compulsão</i>	40
4.3.3 <i>Grupo Ciclagem de Peso 2 (CP2) – Modelo Restrição e Controle</i>	41
4.3.4 <i>Grupo Modelo Compulsão Alimentar – CA</i>	42
4.4 Avaliação do Consumo Alimentar	42
4.5 Avaliação do Peso dos Animais	43
4.6 Testes Comportamentais	43

4.6.1 <i>Labirinto em Cruz Elevado</i>	43
4.6.2 <i>Marble Burying</i>	44
4.7 Determinação dos níveis do NMUR2 no Hipotálamo por Imunoblot.....	46
4.8 Análise Estatística.....	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Efeito dos Diferentes Padrões de Dietas no Peso Corporal dos Camundongos.....	48
5.2 Efeito dos Diferentes Padrões de Dietas no Consumo Alimentar.....	50
5.3 Efeito dos Diferentes Padrões de Dietas em um Modelo de Ansiedade.....	53
5.4 Efeito dos Diferentes Padrões de Dietas em um Modelo de Compulsão.....	54
5.5 Níveis Proteicos de NMUR2 no Hipotálamo.....	55
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE A – Aprovação do Estudo pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Espírito Santo	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade: conceito e aspectos gerais

A obesidade e o sobrepeso são hoje um problema de saúde pública mundial (WHO, 2018). Apesar das ações de estratégias de políticas públicas e pesquisas científicas sobre o tema, a prevalência de obesidade é crescente, mesmo nos diferentes estratos sociais, faixas etárias, sexo e etnias (WHO, 2015; FAO et al, 2019). A Organização Mundial da Saúde (OMS), caracteriza a obesidade como o excesso de peso causado por um desequilíbrio no balanço energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas (WHO, 2018). A etiologia da obesidade é multifatorial e complexa, envolvendo dentre eles fatores genéticos, biológicos, psicossociais, sociais e ambientais (CONTRERAS; SCHRIEVER; PFLUGER, 2019). Adultos com sobrepeso e obesidade apresentam níveis mais elevados de proteína C reativa circulante, cortisol, risco cardiometabólico de longo prazo e aumento da mortalidade quando comparados com obesos que não experimentaram discriminação de peso (RUBINO et al., 2020).

O método mais comum para diagnóstico da obesidade é o Índice de Massa Corporal (IMC) (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). Segundo a OMS, o IMC é um índice de peso para altura, o qual é estabelecido pela divisão do peso em kg pelo quadrado da altura em metros. De acordo com o IMC, o indivíduo pode ser classificado como baixo peso ($IMC < 18,50 \text{ kg/m}^2$), peso normal ($IMC 18,50$ a $24,99 \text{ kg/m}^2$), sobrepeso ($IMC 25,00$ a $29,99 \text{ kg/m}^2$), obesidade grau I ($IMC 30,00$ a $34,99 \text{ kg/m}^2$), obesidade grau II ($IMC 35,00$ a $39,99 \text{ kg/m}^2$) e obesidade grau III ($IMC \geq 40,00 \text{ kg/m}^2$) (WHO, 2018).

Os valores de IMC são estabelecidos independentes da idade e sexo. No entanto, o IMC pode não corresponder ao mesmo grau de gordura corporal em diferentes populações, devido, em parte, a diferenças nas proporções corporais. (OMS, 2018). Apesar de ser uma medida generalista, o IMC traz um parâmetro de riscos à saúde quando esse valor está acima de 25 kg/m^2 . Tanto o IMC quanto a medida da distribuição de gordura (circunferência da cintura: relação do quadril) são importantes fatores no cálculo do risco de comorbidades da obesidade (WHO, 2000). Entretanto, o novo Guia Canadense para o tratamento da obesidade sugere que o peso não deve definir a obesidade. Ao definir a obesidade como uma doença apenas pelo IMC corre-se o risco de rotular indevidamente como obesos alguns

indivíduos (por exemplo, nos casos em que o IMC alto resulta do indivíduo ser particularmente musculoso ou ter baixa estatura) (RUBINO et al., 2020; WHARTON et al., 2020). As novas diretrizes demonstram que pequenas reduções de peso (3 a 5%) já podem melhorar a saúde do indivíduo, sendo que a estabilidade desse peso após adotar comportamentos saudáveis poderia ser considerado "melhor peso" ou "peso saudável" e não corresponder ao "peso ideal" de acordo com o IMC (RUBINO et al., 2020; WHARTON et al., 2020).

Apesar dos aspectos multifatoriais no desenvolvimento da obesidade, estilo de vida como ingestão alimentar excessiva e o sedentarismo são considerados os principais fatores precipitantes (YEUNG; SHI; SUNG, 2021). A homeostase da energia é regulada de forma complexa pelo sistema nervoso central (SNC) e promove a manutenção do peso corporal, sendo que o excesso calórico leva a um acúmulo de peso, principalmente na forma de massa gorda (CONTRERAS; SCHRIEVER; PFLUGER, 2019; TERANISHI; HANADA, 2021). O ganho de peso em excesso muda a composição corporal associado a um aumento da quantidade de triglicerídeos e do diâmetro dos adipócitos (hipertrofia). Os adipócitos hipertrofiados secretam fatores parácrinos que induzem a proliferação de pré-adipócitos (hiperplasia), sendo assim o excesso de ingestão calórica pode levar a aumentos tanto no tamanho das células de gordura e no número dessas células (OCHNER et al., 2013). A hipertrofia dos adipócitos diminui com a perda de peso, porém a hiperplasia permanece, sendo reduzido o tamanho, mas não o número de células de gordura (OCHNER et al., 2013). Os adipócitos menores podem estimular o ganho de peso diminuindo a lipólise e aumentando a lipogênese (OCHNER et al., 2013). O sobrepeso e a obesidade estão associados a níveis elevados de glicose, insulina, leptina e citocinas inflamatórias, sendo que o desequilíbrio desses marcadores se relaciona a outras comorbidades, tais como: hipertensão, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, resistência à insulina, diabetes do tipo 2, osteoartrite, esteatose hepática, doenças renais, câncer e problemas respiratórios (DANDONA; ALJADA; BANDYOPADHYAY, 2004; KOPELMAN, 2007). Adicionalmente, há uma relação entre obesidade e distúrbios psiquiátricos, como ansiedade, transtornos de humor e transtorno da Compulsão Alimentar (TCA) (SMITS et al., 2010).

1.2 Neurobiologia do Comportamento Alimentar

1.2.1 Aspectos gerais e circuitos que regulam os comportamentos alimentares

A ingestão alimentar é um comportamento complexo regulada por sistemas neurais que integram necessidades nutricionais homeostáticas e não homeostáticas (hedônicos ou de recompensa) interagindo com o sistema de regulação inibitória (RIBEIRO, SANTOS, 2013; COCCURELLO & MACCARRONE, 2018; DE CEGLIA et al., 2021). Enquanto os sistemas cerebrais homeostáticos detectam e integram uma infinidade de mensagens periféricas e ambientais para regular a homeostase energética, o sistema da alimentação hedônica está relacionado a mecanismos neurais associados a recompensa dentro do sistema límbico e envolvem respostas comportamentais, biológicas e cognitivas (CONTRERAS; SCHRIEVER; PFLUGER, 2019; MURRAY et al., 2014).

A homeostasia alimentar e calórica envolve o equilíbrio das fontes de energia metabólica do organismo (macronutrientes) e substâncias químicas essenciais aos processos metabólicos (micronutrientes) (OCHNER et al., 2013). O sistema homeostático é composto principalmente pelos núcleos do hipotálamo, incluindo o núcleo arqueado (ARC), hipotálamo dorsomedial (DMH), núcleo paraventricular (PVN), hipotálamo ventromedial (VMH) e hipotálamo lateral (LH) (SUYAMA; YADA, 2018). Esses núcleos hipotalâmicos impulsionam a alimentação em resposta à necessidade calórica para manter o equilíbrio energético e sendo que o ARC é reconhecido como estrutura de primeira ordem que é regulado por vários sinais periféricos incluindo níveis de adiposidade, hormônios orexígenos (grelina) e anorexígenos (leptina, insulina, PYY, CCK, dentre outros), DMH e LH são reconhecidos como os centros da fome, VMH como o centro da saciedade e PVN como o centro integrativo (SUYAMA; YADA, 2018; RIBEIRO; SANTOS, 2013; SMITH et al., 2019). Os grupos de neurônios orexígenos são compostos pelo peptídeo relacionado à Agouti (AgRP) e do neuropeptídeo Y(NPY), enquanto dos anorexígenos são compostos por transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (CART) e pró-opiomelanocortina (POMC) (FURIGO et al., 2019; KEEN-RHINEHART; ONDEK; SCHNEIDER, 2013; MURRAY et al., 2014) (Figura 1).

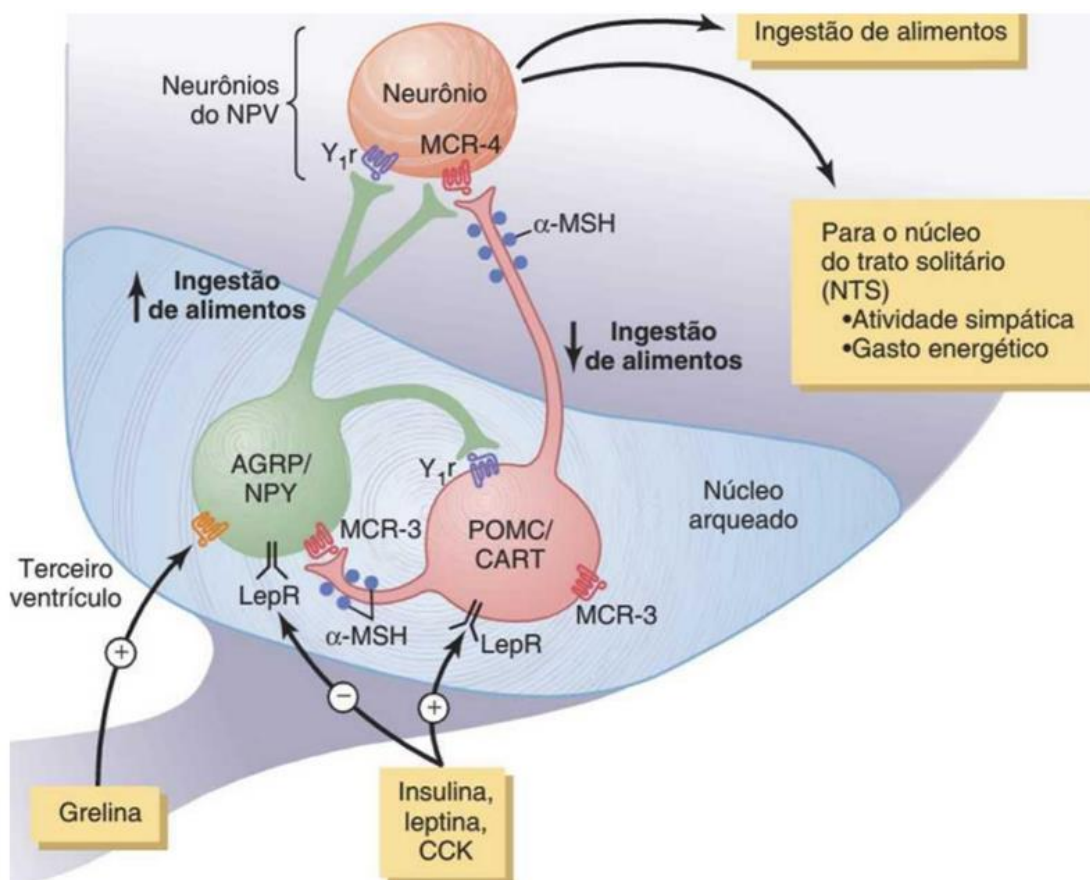


Figura 1 – Controle do equilíbrio energético pelos dois tipos de neurônios do núcleo arqueado: (1) neurônios pró-opiomelanocortina (POMC) que liberam o hormônio estimulante de a-melanócito (α-MSH) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), reduzindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético e (2) neurônios que produzem a proteína relacionada à agouti (AGRP) e o neuropeptídeo Y (NPY), aumentando a ingestão alimentar e reduzindo o gasto energético. O AGRP atua como um antagonista do MCR-4. Insulina, leptina e colecistocinina (CCK) são hormônios que inibem os neurônios AGRP-NPY e estimulam os neurônios POMC- CART adjacentes, reduzindo assim a ingestão alimentar. A grelina, um hormônio secretado pelo estômago, ativa os neurônios AGRP-NPY, estimulando a ingestão de alimentos (GUYTON, 2007).

Após redução dos depósitos de gordura, jejum, perda de peso, restrição calórica, lactação e atividade física intensa neurônios presentes no ARC que se projetam para áreas como o PVN são ativados, onde receptores para o NPY são abundantes promovendo efeitos orexígenos (FURIGO et al., 2019; KEEN-RHINEHART; ONDEK; SCHNEIDER, 2013). A síntese de POMC, precursor da melanocortina, se correlaciona de forma inversamente com o tempo de jejum, associados a efeitos anorexígenos (KEEN-RHINEHART; ONDEK; SCHNEIDER, 2013; MURRAY et al., 2014).

A Insulina, Grelina e Leptina são hormônios importantes que atuam no hipotálamo na regulação homeostática (MORTON; MEEK; SCHWARTZ, 2014). A

insulina é um hormônio peptídico secretado pelas células β das ilhotas de *Langerhans* pancreática, que tem como funções, regular o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, controlar a quantidade de glicose no sangue ao proporcionar a captação da glicose nas células pelos transportadores de glicose (GLUTs) (WILCOX, 2005). A insulina age como um sinal anorexígeno dentro do SNC, principalmente no núcleo arqueado do hipotálamo e que sua liberação e/ou sensibilidade celular alterada pode iniciar uma cascata de eventos intracelulares que colaboram para obesidade e diabetes (WILCOX, 2005) (Figura 2). A grelina é um hormônio peptídico considerado um fator orexígeno encontrado no duodeno, no íleo, no ceco e no cólon, mas principalmente no estômago (KOJIMA et al., 1999). O esvaziamento gástrico estimula a secreção grelina pelo estômago, que por sua vez, atravessa a barreira hematoencefálica e ativa principalmente os neurônios que secretam o PYY e AgRP e estimulam a liberação de GABA, o que leva ao aumento da ingestão de alimentos, e regulação do balanço energético em curto prazo (COCCURELLO; MACCARRONE, 2018; MURRAY et al., 2014). A secreção de grelina também é ajustada de acordo com o ritmo circadiano e sua ação não se limita apenas ao estímulo da fome, ela exerce também controle sobre a homeostase da glicose, além de inibir a secreção de insulina (COCCURELLO; MACCARRONE, 2018). A Leptina é um hormônio anorexígeno proteico produzido pelos adipócitos, proporcional à quantidade de tecido adiposo do indivíduo. (CONSIDINE; CARO, 1996; TERANISHI; HANADA, 2021). A leptina age como um inibidor do apetite produzindo efeito de saciedade através da ativação de neurônios inibitórios, ou seja, quando seu nível no sangue aumenta, ela atinge o receptor de leptina no LH, diminuindo a vontade de comer através da inibição simultânea de neurônios orexígenos que expressão NPY e AgRP e ativação de neurônios anorexígenos POMC dentro do ARC (COCCURELLO; MACCARRONE, 2018).

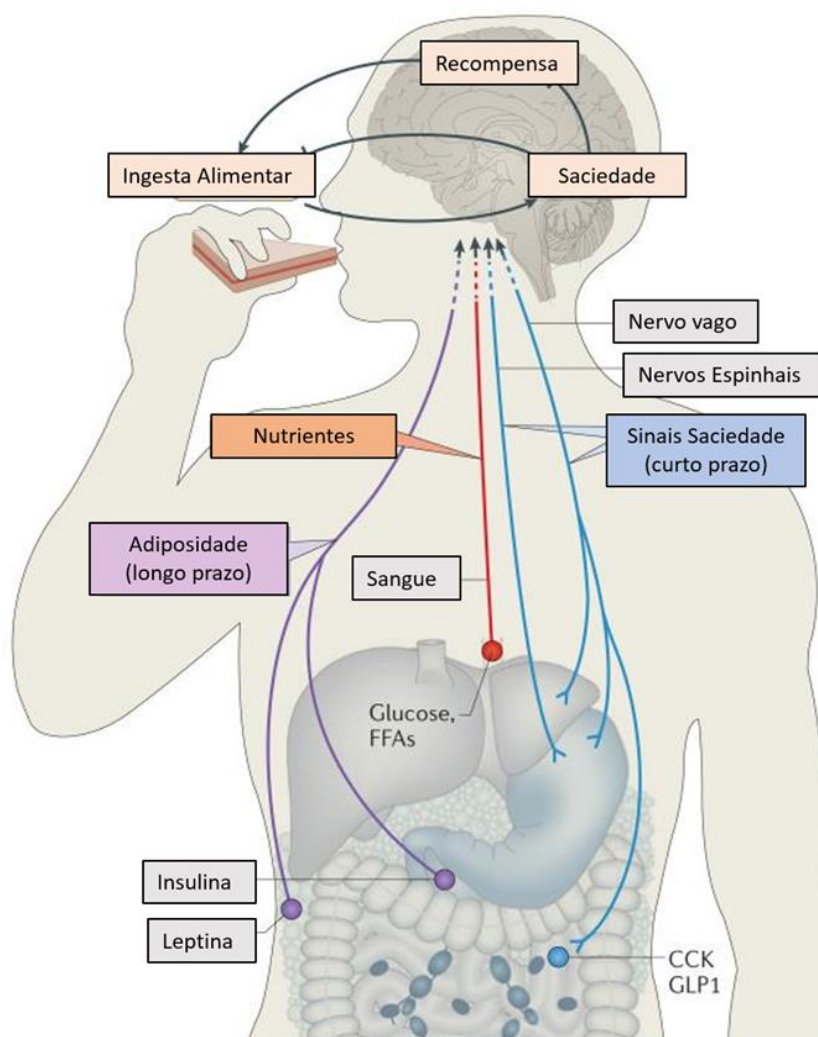


Figura 2 – Regulação da homeostase energética no SNC.

O SNC regula a ingestão de alimento e o gasto de energia através de sinais relacionados a estoques de energia a longo prazo (por exemplo leptina, insulina, CCK, GLP1) e relacionados a ingestão alimentar de curto prazo, trabalhando para manter o estoque de gordura corporal estável ao longo do tempo. A ingestão alimentar diminui propriedades de recompensa e aumenta a saciedade. A privação de energia aumenta propriedades recompensadoras e reduz a saciedade. Fonte: Adaptado (MORTON; MEEK; SCHWARTZ, 2014).

Além do mecanismo homeostático, o mecanismo hedônico também regula o comportamento alimentar e a ingestão crônica de alimentos hiperpalatáveis pode ser uma das causas das alterações neuroquímicas em regiões cerebrais associadas à recompensa (RIBEIRO; SANTOS, 2013). Segundo Ochner et al. (2013), o aumento na responsividade neural relacionada à recompensa reflete um possível reforço no desejo por alimentos considerados proibidos para indivíduos em dieta para

emagrecimento e pode ser um fator potencial para recuperação de peso após a perda de peso.

O processamento de recompensa depende do sistema mesocorticolímbico dopaminérgico, nas áreas Tegumentar Ventral (VTA), Núcleo Accumbens (NAC), Amígdala, Córtex Pré-Frontal (PFC) e outras regiões do cérebro anterior (COCCURELLO; MACCARRONE, 2018; NARAYANAN; GUARNIERI; DILEONE, 2010). O sistema dopaminérgico mesolímbico está associado ao sistema de recompensa onde vários neurotransmissores, incluindo serotonina, encefalina, ácido γ -aminobutírico (GABA), dopamina (DA), acetilcolina (ACH), dentre outros, atuam em conjunto para a liberação de DA no NAc (COCCURELLO & MACCARRONE, 2018). A dopamina está envolvida nos processos de recompensa através das projeções oriundas da VTA, projetando para o Nac (COCCURELLO & MACCARRONE, 2018). Outras áreas envolvidas em processos de recompensa incluem o núcleo accumbens (Nac), o córtex orbitofrontal (COF), o córtex cingulado anterior e o *pallidum* ventral e adicionalmente, a amígdala, o hipocampo e outras estruturas específicas do tronco encefálico são os componentes importantes do circuito de recompensa. (RIBEIRO; SANTOS, 2013; COCCURELLO & MACCARRONE, 2018).

Evidências demonstraram que hormônios metabólicos periféricos como a grelina, leptina e insulina além de atuar no hipotálamo podem atuar nos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo para influenciar a alimentação (NARAYANAN; GUARNIERI; DILEONE, 2010). Além da regulação homeostática, a insulina possui outras funções cerebrais envolvidas na alimentação hedônica. Receptores de insulina foram encontrados em neurônios dopaminérgicos na VTA, indicando seu papel no sistema de recompensa.

A leptina também regula o valor do incentivo e recompensa por alimentos e nutrientes e atua nos circuitos neuronais hedônicos, cognitivos e de estresse (COCCURELLO; MACCARRONE, 2018). Embora o papel da leptina no sistema homeostático esteja mais bem compreendido, evidências recentes demonstram sua relação com o sistema de recompensa, pela presença de receptores de leptina em neurônios dopaminérgicos na VTA projetando-se no Nac (MURRAY et al., 2014). Múltiplos mecanismos estão envolvidos nos efeitos da leptina no sistema dopaminérgico mesolímbico e evidências indicam que a leptina atua principalmente no VTA e LHA para diminuir a ingestão de alimentos. Sendo assim, a leptina está

envolvida no comportamento alimentar via sistema homeostático e hedônico (MURRAY et al., 2014) (Figura3).

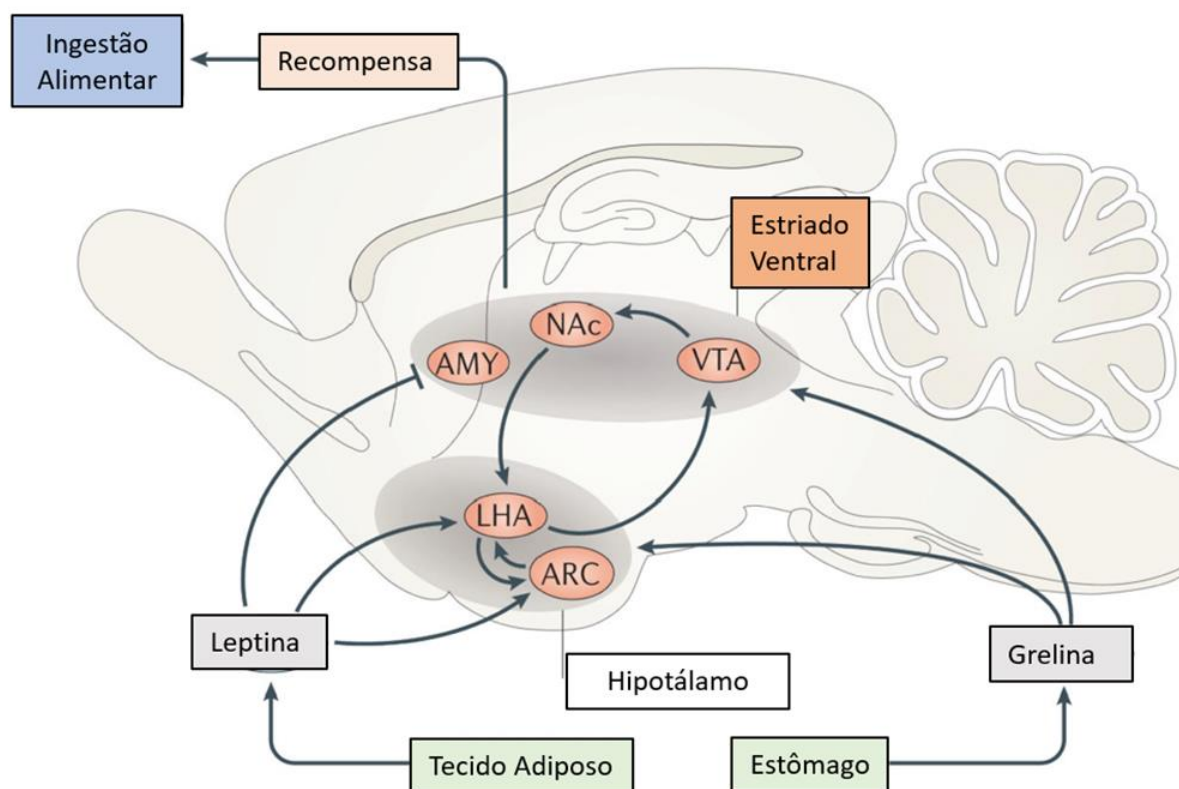


Figura 3 – Integração de insumos homeostáticos relacionados à recompensa.

Os sinais homeostáticos modulam a percepção da recompensa alimentar. Neurônios dopaminérgicos mesolímbicos na área tegmental ventral (VTA) projetam-se para o núcleo accumbens (Nac) e outras áreas do cérebro para aumentar o valor de recompensa dos alimentos palatáveis. Os neurônios na área hipotalâmica lateral (LHA) integram a entrada relacionada à recompensa do Nac com informações relacionadas à homeostase energética dos neurônios do núcleo arqueado (ARC). Por sua vez, os neurônios LHA projetam e influenciam o sistema dopaminérgico mesolímbico, ao mesmo tempo em que influenciam a percepção de saciedade. A perda de peso reduz os níveis plasmáticos de insulina e leptina enquanto aumenta os níveis plasmáticos de grelina. Trabalhando em conjunto, essas respostas aumentam as propriedades recompensadoras dos alimentos e, portanto, a motivação para comer por meio de efeitos diretos no corpo estriado ventral ou efeitos indiretos no hipotálamo através do LHA. Por outro lado, após períodos de balanço energético positivo, o peso corporal retorna ao seu nível biologicamente defendido por meio de uma diminuição nas propriedades recompensadoras dos alimentos e um aumento da resposta aos sinais de saciedade. Fonte: Adaptado (MORTON; MEEK; SCHWARTZ, 2014).

A grelina aumenta a ativação das projeções dopaminérgicas do VTA para o Nac, o que aumenta a ativação de receptores dopaminérgicos DRD1 e DRD2 e leva ao aumento dos níveis de DA e aumentando o valor da recompensa alimentar (COCCURELLO; MACCARRONE, 2018; MURRAY et al., 2014). Em resposta à privação de energia, as respostas adaptativas do SNC aumentam as propriedades

de recompensa dos alimentos e reduzem a resposta aos sinais de saciedade, resultando no aumento do consumo de alimentos até que reservas de gordura deficientes sejam reabastecidas (OCHNER et al., 2013). O papel da grelina, leptina e insulina na liberação de dopamina na via mesolímbica sugere que o sistema homeostático e o sistema de recompensa coexistem e interagem formando um quebra cabeça entre estado nutricional e busca pelo prazer (COCCURELLO; MACCARRONE, 2018). O sistema inibitório, composto principalmente pelo córtex pré-frontal dorsolateral está associado à inibição comportamental perante estímulos homeostáticos e hedônicos para regular a alimentação excessiva (COCCURELLO; MACCARRONE, 2018) (figura 4).

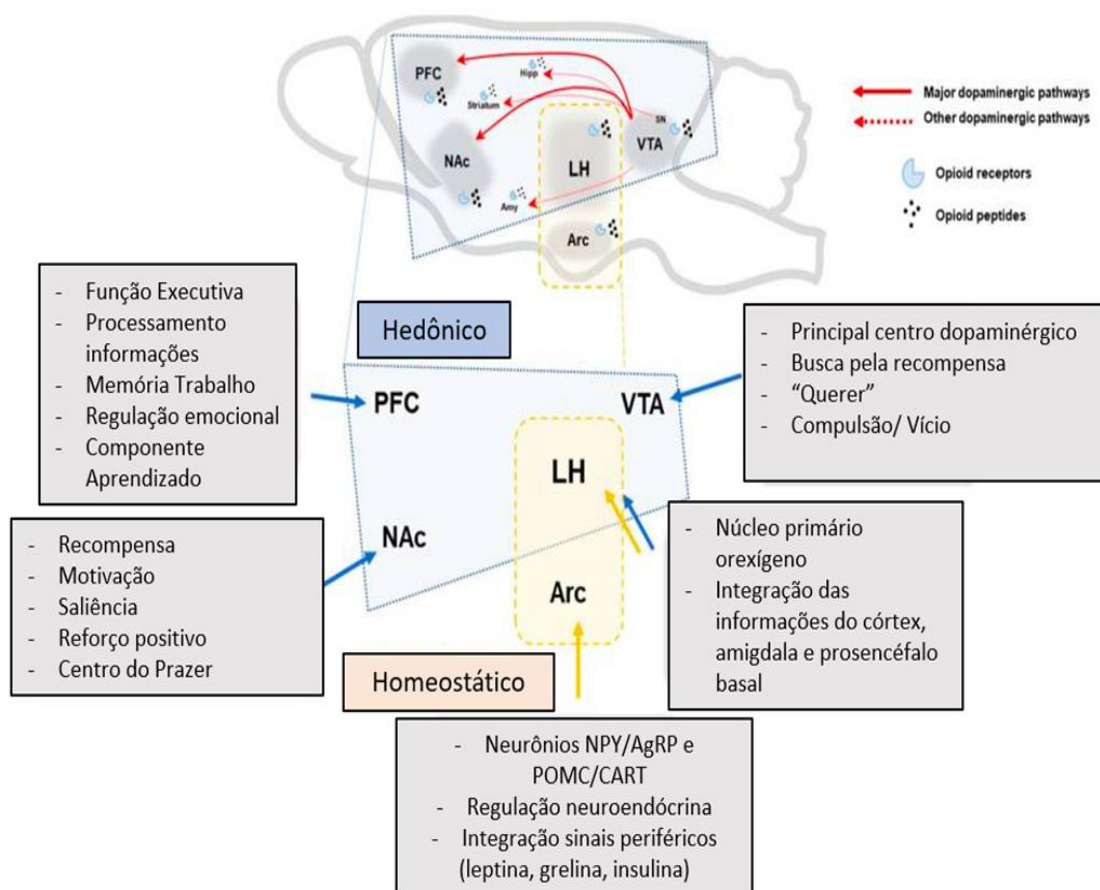


Figura 4 – Representação esquemática das principais estruturas cerebrais implicadas em processos hedônicos e homeostáticos.

As principais vias dopaminérgicas, via mesolímbica e mesocortical, são representadas com linhas vermelhas e outras conexões dopaminérgicas menores com linhas vermelhas quebradas. Existe uma interseção entre as vias homeostáticas e hedônicas cujo a influência principal do hipotálamo lateral. Fonte: Adaptado (NOVELLE; DIÉGUEZ, 2018).

1.3 Ciclagem de Peso

A restrição alimentar através da dieta é a estratégia mais utilizada para o controle do peso corporal, porém existem evidências da ineficiência destas restrições em longo prazo (OCHNER et al., 2013;. Estratégias não cirúrgicas para perda de peso de longo prazo continuam a falhar devido à recuperação do peso (CONTRERAS; SCHRIEVER; PFLUGER, 2019). A manutenção da perda de peso bem-sucedida é definida como um indivíduo que diminui voluntariamente mais de 10% do peso corporal e mantém o peso por mais de um ano. Mesmo com estratégias não farmacológicas adicionais (incluindo atividade física e dieta) até 50% do peso perdido é normalmente recuperado em 1 ano de acompanhamento (OCHNER et al., 2013) Um terço dos indivíduos que emagrecem recuperam parte ou todo o peso perdido levando a repetidas tentativas de perder peso com recuperação subsequente (KAKINAMI; KNAÜPER; BRUNET, 2020).

A ciclagem de peso pode ser definida pela perda de peso intencional significativa (> 5% do peso corporal) com recuperação do peso corporal de forma repetida. Esse “efeito sanfona” pode trazer riscos à saúde pelo desenvolvimento de resistência à insulina, alteração da composição corporal (aumento massa gorda e diminuição de massa magra) e síndrome metabólica (BOSY-WESTPHAL et al., 2015; JARDIM, 2019; KAKINAMI; KNAÜPER; BRUNET, 2020). A recuperação do peso corporal de 2 a 6% já pode reverter os benefícios de perder $\geq 10\%$ do peso corporal (CONTRERAS; SCHRIEVER; PFLUGER, 2019).

Além disso, os efeitos fisiológicos e cognitivos após dietas restritivas indicam associação com o desenvolvimento de diversos transtornos alimentares em indivíduos predispostos e aumento de peso a longo prazo (OCHNER et al., 2013). O corpo possui um mecanismo que defende o peso de equilíbrio, ou seja, após drástica perda de peso, o organismo encara o emagrecimento como ameaça e reage alterando o metabolismo, aumentando a fome, causando alterações hormonais e dos sinais secretórios (OCHNER et al., 2013; CONTRERAS; SCHRIEVER; PFLUGER, 2019). Os mecanismos conhecidos incluem a morfologia e metabolismo das células adiposas, função endócrina (principalmente alterações na sensibilidade à leptina), metabolismo energético, neurobiologia e mecanismos de recompensa (OCHNER et al., 2013).

Durante a perda de peso os níveis de leptina são alterados, sendo diminuídos de acordo com a perda de massa gorda. Além da leptina, o hormônio de crescimento (GH) também sofre essa alteração neuroendócrina durante a privação de alimento. O papel do GH no comportamento alimentar após a perda de peso está associado com a ativação de neurônios da proteína relacionada a AgRP (FURIGO et al., 2019). A secreção de GH aumenta durante situações de deficiência de nutrientes, como hipoglicemia ou privação alimentar (FURIGO et al., 2019). Em camundongos, a restrição alimentar em 40% do habitual por dois dias causou supressão de hormônios tireoidianos, aumento da secreção de glicocorticoides, aumento da expressão de AgRP e neuropeptídeo Y (NPY) hipotalâmico e diminuição da expressão da POMC (FURIGO et al., 2019).

As concentrações de leptina plasmática, hormônio que atua na regulação da saciedade, também são influenciadas pelo tamanho dos adipócitos, sendo que maior tecido adiposo leva a uma maior liberação de leptina (OCHNER et al., 2013). Após a perda de peso a secreção de leptina é diminuída levando ao aumento da fome, diminuição da taxa metabólica, redução do metabolismo da tireoide exercendo um papel importante na recuperação do peso perdido (OCHNER et al., 2013).

Um estudo pré-clínico com camundongos obesos que tiveram rápida perda de peso por restrição calórica demonstraram hiperfagia quando alimentados com ração *ad-libitum* levando a um ganho de peso acelerado (KIRCHNER et al., 2012). Em contraste, quando camundongos obesos foram submetidos a uma perda de peso lenta induzida por alimentação *ad libitum* com dieta de baixa caloria, não desenvolveram hiperfagia, além da manutenção do peso reduzido (FISCHER et al., 2018). O modo como a perda de peso é alcançado parece ser de importância crucial (CONTRERAS; SCHRIEVER; PFLUGER, 2019). Se o emagrecimento é alcançado com restrição calórica severa, fortes estímulos contrarreguladores entram em ação, já a perda de peso lenta baseada em uma dieta mais saudável, parece evitar algumas das respostas adaptativas para recuperar o peso perdido (CONTRERAS; SCHRIEVER; PFLUGER, 2019).

Em um estudo clínico sobre o impacto da ciclagem de peso na saúde, Jardim (2019) avaliou parâmetros como composição corporal, doenças e componentes metabólicos em mulheres. Nesta revisão ficou evidenciado que mulheres que apresentavam ciclagem de peso tinham maior probabilidade de apresentar maior

IMC e acúmulo de gordura corporal. Adicionalmente, nos grupos que apresentaram ciclagem de peso, foi observado aumento do colesterol total, perda de massa muscular, maior risco para desenvolvimento diabetes tipo 2 e aumento do apetite através de alteração dos níveis hormonais de grelina (JARDIM, 2019). Após a ciclagem de peso foi verificada alteração na composição corporal, sendo que durante a recuperação de peso o acúmulo de massa gorda foi favorecido enquanto houve diminuição da massa muscular (OCHNER et al., 2013).

Além dos fatores metabólicos descritos até o momento, a ciclagem de peso está associada a forte aumento no valor de recompensa dos alimentos que se estende por um período além da fase rápida do emagrecimento (CONTRERAS; SCHRIEVER; PFLUGER, 2019) O sistema de recompensa também fica alterado após a perda de peso, gerando propensão a consumir mais alimentos de alto teor calórico. O emagrecimento de curto prazo sugere um aumento na responsividade inibitória que consegue sustentar apenas temporariamente os impulsos neurobiológicos para ingestão de alimentos hipercalóricos (CONTRERAS; SCHRIEVER; PFLUGER, 2019).

1.4 Transtorno da Compulsão Alimentar (TCA)

Os transtornos alimentares são caracterizados por uma perturbação persistente na alimentação ou no comportamento relacionado à alimentação que altera o consumo ou absorção de alimentos comprometendo significativamente a saúde física ou o funcionamento psicossocial. Os principais transtornos alimentares com critérios diagnósticos estabelecidos são: Anorexia Nervosa (AN), Bulimia Nervosa (BN) e TCA (PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

A compulsividade é um comportamento observado em diferentes distúrbios, como dependência de drogas e alimentação patológica sendo caracterizada pela perda de controle sobre o comportamento que resulta no uso contínuo, apesar das consequências negativas (MOORE et al., 2017). Comer compulsivamente foi descrito pela primeira vez por Stunkard na década de 1950 em indivíduos obesos em tratamento para emagrecimento e desde então vários estudos têm demonstrado que indivíduos não obesos também podem apresentar critérios diagnósticos compatíveis com TCA (CORDÁS; KACHANI, 2000).

O TCA é um problema de saúde pública pouco reconhecido, porém prevalente em todo mundo, afetando cerca de 3,5% das mulheres e, 2% dos homens adultos (PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). O TCA é caracterizado por episódios recorrentes de compulsão alimentar que devem ocorrer ao menos uma vez por semana durante três meses e é classificado de acordo com o nível de gravidade baseado na frequência de episódios de compulsão alimentar (PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

O episódio de compulsão alimentar é caracterizado pela ingestão de uma grande quantidade de alimento numa quantidade maior do que a maioria das pessoas ingere, atrelada a uma incapacidade de controlar essa ingestão exagerada. Esse padrão de compulsão possui aspectos típicos, tais como: comer mais rapidamente do que o normal, comer até se sentir desconfortavelmente cheio, comer grandes quantidades de alimento na ausência da sensação física de fome, comer sozinho por vergonha do quanto se está comendo, sentir-se desgostoso de si mesmo, deprimido ou muito culpado em seguida (MOORE et al., 2017; PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

O desenvolvimento do TCA é multifatorial e envolve fatores genéticos, psicossociais e comportamentais como a prática de fazer dieta (DINGEMANS; DANNER; PARKS, 2017; PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Apesar do TCA estar mais associado ao sobrepeso e a obesidade, indivíduos de peso normal também podem apresentar esse transtorno. Com isso pode-se afirmar que a maioria dos indivíduos obesos não apresentam TCA, porém grande parte dos indivíduos diagnosticados com TCA apresentam sobrepeso e obesidade devido à alta ingestão calórica durante os episódios de compulsão (PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). É comum (67% a 79%) existirem outras comorbidades psiquiátrica no indivíduo com TCA sendo os mais comuns transtornos bipolares, transtornos depressivos, transtornos de ansiedade e, em um grau menor, transtornos por uso de substância (DINGEMANS; DANNER; PARKS, 2017; PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

A ingestão de alimentos é em parte mediada por processos de recompensa e reforço que podem se tornar desregulados nos transtornos alimentares. A aprendizagem por reforço para estímulos habituais é mediada pelo corpo estriado, uma área composta por regiões ventrais (*nucleus accumbens*, NAc) e dorsais (EVERITT; ROBBINS, 2016). Em um estudo pré-clínico utilizando ratos, o acesso de longo prazo a alimentos hiperpalatáveis ocasiona a formação de hábitos

compulsivos que são resistentes a consequências aversivas (FURLONG et al., 2014).

O TCA é conceituado como um transtorno alimentar impulsivo / compulsivo que possui alteração no circuito corticoestriatal, via da recompensa, semelhante às pessoas com abuso de drogas (KESSLER et al., 2016). A impulsividade e a desinibição comportamental estão associadas a maior ingestão de alimentos e maior gravidade do TCA, sendo explicada pelo comprometimento entre O M_pFC e NAc e a diminuição do controle inibitório (SMITH et al., 2019).

A necessidade de comer compulsivamente é mediada pela hiperatividade do córtex orbito frontal e do córtex cingulado anterior (ACC) e hipoatividade do controle inibitório prejudicado dos circuitos pré-frontais laterais (KESSLER et al., 2016; MOORE et al., 2017). As principais alterações ocorrem na função do córtex pré-frontal, insular, córtex órbita frontal e estriado sendo que nos indivíduos com TCA passam do modo de consumo alimentar relacionado à recompensa ventro-estriatal para um modo impulsivo/ compulsivo dorso-estriado de consumo alimentar relacionado à recompensa (KESSLER et al., 2016).

Exames de imagem de ressonância magnética funcional demonstraram a ativação das áreas de recompensa (principalmente estriado dorsal e córtex orbito frontal) em resposta a estímulos alimentares em indivíduos com obesidade, sendo que o grau de ativação aumenta de acordo com imagens de alimentos hipercalóricos independente da saciedade (MURRAY et al., 2014).

Indivíduos com TCA e obesidade apresentam maiores níveis de dopamina no NAc ao ver, cheirar e saborear alimentos, tendo uma associação positiva entre aumento dos níveis de dopamina no caudado e a gravidade da compulsão alimentar. (MURRAY et al., 2014) Enquanto o NAc desempenha um papel fundamental nos efeitos de reforço de alimentos e drogas, o estriado dorsal é pensado para contribuir para o desenvolvimento de vício e compulsão. Os processos de aprendizagem de hábito para comportamento compulsivo e vício são acompanhados por uma mudança concomitante dos circuitos ventrais para os dorsais do estriado (EVERITT; ROBBINS, 2016) (figura 5).

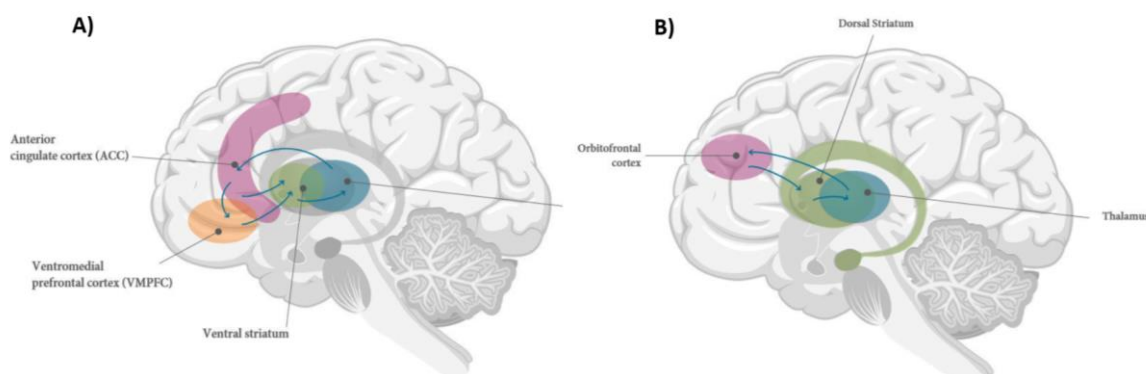


Figura 5 – Circuito da Impulsividade e Compulsividade.

O principal circuito cerebral envolvido na impulsividade envolve o estriado ventral, tálamo, córtex pré-frontal ventromedial e o córtex cingulado anterior (A). O circuito da compulsividade é mediado pelo estriado dorsal, tálamo e córtex órbito frontal (B). Adaptado de (“Neurobiology of Binge Eating Disorder-A Synopsis,” [s.d.]).

Um estudo demonstrou que ratos que receberam alimento hiperpalatável e posteriormente receberam ração habitual consumiam em torno de 160% mais calorias de ração do que os grupos de controle que foram igualmente preparados com hiperpalatável (CORWIN; AVENA; BOGGIANO, 2011). O aumento do consumo alimentar mesmo de alimentos menos preferidos pode ser desencadeado pela ingestão de alimentos hiperpalatáveis e em humanos é atribuído a processos cognitivos superiores (por exemplo, pensamentos autodestrutivos ou racionalizações sobre ganho de peso ou falha em seguir uma dieta (CORWIN; AVENA; BOGGIANO, 2011). Apesar do grande conhecimento sobre os mecanismos relacionados à obesidade e o TCA, novos metabólitos são descobertos e aumentam o intrincado sistema de controle do peso. Nos últimos anos muitos estudos relacionaram o papel da neuromedina (NMU) em vários sistemas fisiológicos relacionados à obesidade e TCA no sistema nervoso central (SNC) e nos tecidos periféricos (TERANISHI; HANADA, 2021).

1.5 Receptor 2 de NMU

Neuromedina U (NMU) é um neuropeptídeo bioativo que foi inicialmente isolado da medula espinhal suína na década de 80 e é altamente encontrado em vertebrados, principalmente em mamíferos. Este neuropeptídeo possui duas formas moleculares principais NMU-23 ou NMU-25, consistindo em 23 ou 25 aminoácidos respectivamente; as outras formas são fragmentos C-terminal de 8 ou 9

aminoácidos, NMU-8 ou NMU-9 (TERANISHI; HANADA, 2021). Desde 2000 foram encontrados receptores específicos para NMU no sistema nervoso central e periférico e, a partir daí, uma melhor compreensão de suas funções fisiológicas (SAMPSON et al., 2018; TERANISHI; HANADA, 2021). Os diferentes peptídeos de NMUs podem atuar como neuromoduladores de circuitos de recompensa e de aprendizagem, a atividade locomotora, devido ao seu papel na contração dos músculos lisos. Atuam no comportamento alimentar, gasto energético, resposta ao estresse, ritmo circadiano e inflamação (WATTEYNE et al., 2020).

As células corticotróficas das adeno-hipófise apresentam altos níveis de NMU. Já o corpo estriado, hipotálamo, medula oblonga, giro do cíngulo e giro frontal médio apresentam níveis moderados de NMUs. Especificamente no hipotálamo, observa-se a presença de NMUs no núcleo arqueado (ARC) e no núcleo supraquiasmático (SCN) em camundongos e ratos. Além disso, O mRNA NMU é abundantemente expresso no núcleo hipotalâmico dorsomedial (DMH) e hipotálamo ventromedial (VMH) em camundongos, mas fracamente expresso no DMH em ratos (TERANISHI; HANADA, 2021).

Existem dois receptores de alta afinidade para NMU, sendo estes o receptor do tipo 1 de neuromedina U (NMUR1) e do tipo 2 (NMUR2) que pertencem ao grupo dos receptores acoplados à proteína G (TERANISHI; HANADA, 2021). O NMUR1 é expresso nos tecidos periféricos como estômago, intestino delgado, pâncreas, córtex adrenal entre outros, pode estar envolvido na regulação do sistema imunológico e nas respostas à dor. O NMUR2, no entanto, é expresso em várias regiões cerebrais como estriado, tálamo, hipotálamo, hipocampo, locus cerúleos, giro cingulado e giro frontal e é altamente expresso em regiões associadas à recompensa alimentar e medeia os efeitos centrais da NMU na ingestão alimentar e no peso corporal (SAMPSON et al, 2018; TERANISHI; HANADA, 2021). O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), pode ser responsável por mediar os efeitos anorexígenos de NMUs (BENSON et al., 2014). O alvo neuroanatômico dos neurônios contendo NMUR2 no PVN poderia ser o núcleo parabraquial. O núcleo parabraquial é capaz de modular a preferência alimentar e o comportamento alimentar através da regulação da liberação de dopamina no sistema límbico e embora o núcleo parabraquial receba principalmente projeções de neurônios gustativos de segunda ordem encontrados no núcleo do trato solitário, ele também recebe aferências

diretamente do PVN. Portanto, os neurônios NMUR2 podem se projetar para o núcleo parabraquial que, por sua vez, modificaria a liberação de dopamina em regiões do sistema límbico, como o núcleo accumbens e, finalmente, alteraria os comportamentos alimentares específicos para alimentos com alto teor de gordura (BENZON et al., 2014) (figura 6).

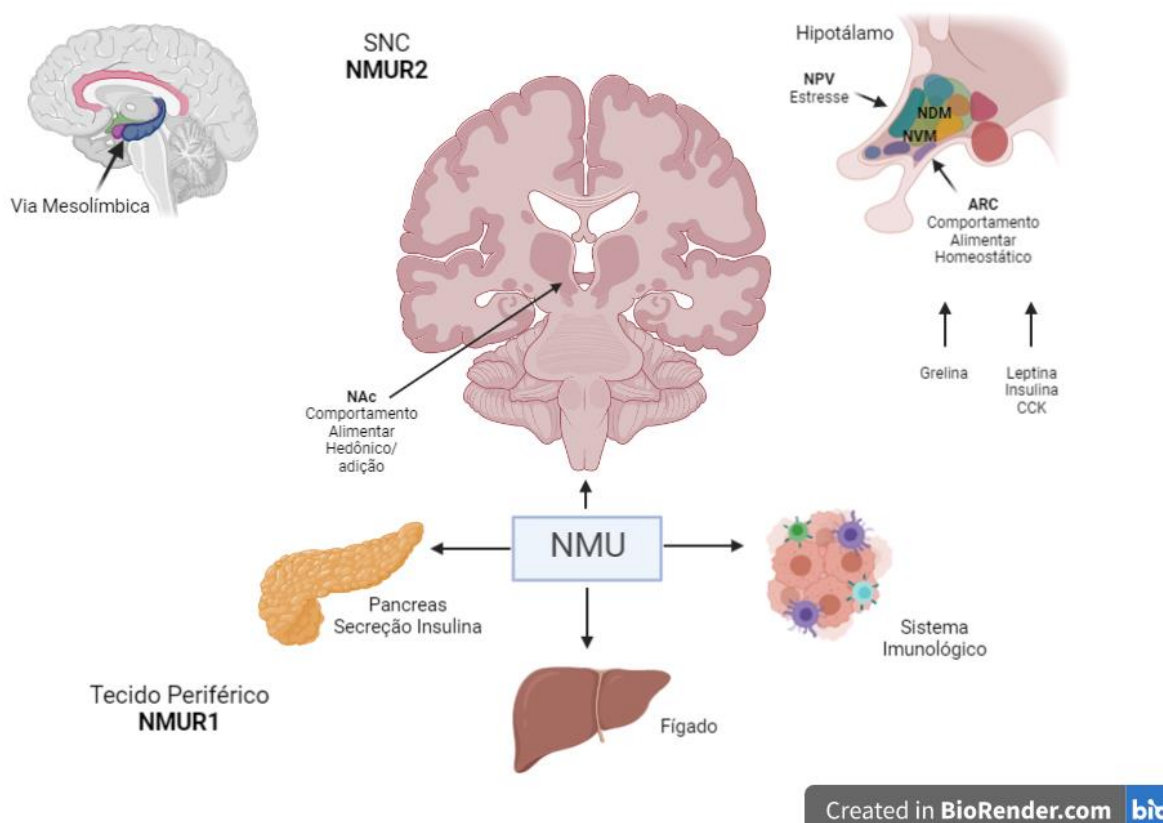


Figura 6 – Desenho esquemático exemplificando a ação da NMU nos tecidos periféricos e no SNC. Ação da NMU nos tecidos periféricos como pâncreas, fígado e sistema imunológico via NMUR1, e no sistema nervoso central via NMUR2 influenciando principalmente o comportamento alimentar hedônico associado ao NAc. Fonte: BioRender.

NMU está associado ao comportamento alimentar homeostático e hedônico (TERANISHI; HANADA, 2021). Camundongos deficientes em NMU são hiperfágicos, obesos e apresentam atividade metabólica diminuída. Por outro lado, a administração sistêmica do peptídeo NMU suprime a ingestão de alimentos e causa perda de peso (SAMPSON et al., 2018). Variantes do gene NMU também foram associadas à obesidade, enquanto estudos mostraram também que a NMU é regulada em animais submetidos a restrição calórica. Juntas, essas informações sugerem que a NMU desempenha um papel importante na regulação da alimentação e do peso corporal (SAMPSON et al., 2018).

Num estudo com camundongos nocaute para NMUR2 *observou-se* hiperfágia e padrões aumentados de ingestão de alimentos (SMITH et al., 2019). Por outro lado, camundongos transgênicos que superexpressam NMU foram considerados magros e hipofágicos (PEIER et al., 2009). Em seu estudo PEIER et al. (2009) demonstrou que em camundongos alimentados *ad libitum*, a injeção icv de NMU reduziram a ingestão de alimentos de maneira dose-dependente. Para determinar quais receptores NMU estavam envolvidos na mediação dessa resposta, NMU foi administrado icv a camundongos de tipo selvagem e *Nmur2*^{-/-}. Embora os camundongos do tipo selvagem tenham apresentado uma diminuição significativa na ingestão de alimentos, os camundongos *Nmur2*^{-/-} não mostraram nenhuma mudança no comportamento alimentar após a administração de NMU indicando que as ações anoréxicas da NMU são mediadas por NMUR2.

Além disso, a deleção do *NMUR2* hipotalâmico via RNAi viral resultou em aumento do consumo de alimentos ricos em gordura e compulsão alimentar indicando que o *NMUR2* regula a ingestão de alimentos - um processo que é desregulado no TCA e na obesidade (SMITH et al., 2019; VALLÖF; KALAFATELI; JERLHAG, 2020). Alguns estudos sugerem que a leptina possui um papel na regulação do NMU no hipotálamo e pode ter uma ação estimuladora no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). A leptina tem um papel na regulação da produção de NMU no hipotálamo e em geral, camundongos obesos, assim como humanos obesos, apresentam hiperleptinemia e resistência ao tratamento com leptina exógena; no entanto, camundongos obesos NMU KO têm sensibilidade normal à leptina exógena e os efeitos anorexígenos de NMU permanecem em camundongos ob/ob deficientes em leptina ou camundongos db/db deficientes em receptor de leptina (TERANISHI; HANADA, 2021). Esses achados implicam que as vias de sinalização da NMU e da leptina no hipotálamo são independentes na homeostase energética. A relação entre o sistema NMU e a via de sinalização da leptina ainda é conflitante e ainda precisa ser estudada (TERANISHI; HANADA, 2021).

2 JUSTIFICATIVA

Num cenário crescente de obesidade e sobrepeso, a dieta restritiva para a perda de peso continua sendo o tratamento mais buscado pela grande maioria dos indivíduos obesos, contudo sabe-se que até 50% do peso perdido após a dieta restritiva é normalmente recuperado após um ano e, quase todo o peso perdido é recuperado posteriormente levando o indivíduo à ciclagem de peso. A ciclagem de peso pode ter consequências negativas para a saúde e colaborar para o acúmulo de gordura corporal e manutenção da obesidade, que por sua vez pode estar relacionada a distúrbios psiquiátricos como ansiedade, depressão e TCA. Atualmente cerca de 3,5% das mulheres e 2% dos homens adultos têm episódios recorrentes de compulsão alimentar. Apesar de ser o transtorno alimentar mais prevalente no mundo, a neurobiologia do TCA ainda não é bem compreendida. Nos últimos anos, pesquisas revelaram que a neuromedina U está associada ao comportamento alimentar homeostático e hedônico e seu receptor NMUR2 regula tipos específicos de comportamento alimentar em roedores. Achados apontam que a deleção do NMUR2 hipotalâmico resulta em aumento do consumo de alimentos ricos em gordura e compulsão alimentar. Portanto, o interesse na investigação dos níveis deste receptor após a ciclagem de peso visa avaliar se a ciclagem de peso está correlacionada a alterações neurobiológicas associadas ao TCA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar se há alterações nos níveis proteicos do *NMUR2* no hipotálamo de camundongos machos submetidos a dietas envolvendo ciclagem de peso e/ou compulsão alimentar.

3.2 Objetivos Específicos

- Promover ciclagem de peso através de dietas alternadas de restrição calórica e estímulo à compulsão pela oferta de alimentos hiperpalatáveis;
- Analisar as variações do consumo alimentar e do peso corporal dos animais nos diferentes ciclos alimentares das dietas estudadas;
- Averiguar se os diferentes ciclos alimentares das dietas estudadas induzem comportamentos do tipo ansioso/ compulsivo por meio de testes comportamentais;
- Avaliar se os diferentes ciclos alimentares das dietas estudadas alteram os níveis proteicos do *NMUR2* no hipotálamo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo caracterizou-se como uma pesquisa experimental realizada em modelo murino de ciclagem de peso e compulsão alimentar durante a realização do Programa de Mestrado em Neurociências no período de agosto 2019 a fevereiro de 2022. Os estudos comportamentais foram realizados no Laboratório de Neuroquímica e Comportamento (LabNEC), na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). O processamento e as análises bioquímicas foram realizados no Laboratório de Neurofarmacologia (NEUROFAR) na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J provenientes do biotério central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) com idade variando de 8 a 12 semanas. Todos os animais foram criados no biotério do Laboratório de Neuroquímica e Comportamento, na UFES, sob condições padrões: temperatura constante de $23\pm 2^{\circ}$ C, com ciclo claro-escuro de 12h, sendo alojados 05 animais por caixa. Os camundongos receberam água e ração *ad libitum* até serem submetidos aos procedimentos experimentais, no período experimental foi ofertado água *ad libitum* e dieta conforme delineamento. A ração era proveniente do biotério central da UFES. Todas as caixas eram limpas e trocadas três vezes por semana, colocando maravalha limpa fornecida pelo biotério central.

Não houve perda de nenhum animal durante o experimento. Assim, 60 camundongos chegaram ao final do estudo. Os procedimentos estavam de acordo com o previsto pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFES, aprovado sob o protocolo nr. 45/2019 (Anexo A).

4.2 Delineamento Experimental

Quatro protocolos experimentais foram utilizados para investigar o efeito da ciclagem de peso nos níveis proteicos do NMUR2 no hipotálamo. Todos os grupos tiveram ciclos alimentares de acordo com seu respectivo protocolo. No total foram 06 ciclos alimentares de sete dias cada ciclo. Os testes de comportamento foram realizados no dia quarenta e quarenta e um do período experimental, a eutanásia foi realizada no dia quarenta e dois. A figura 7 mostra os detalhes e sequência dos procedimentos experimentais adotados neste estudo.

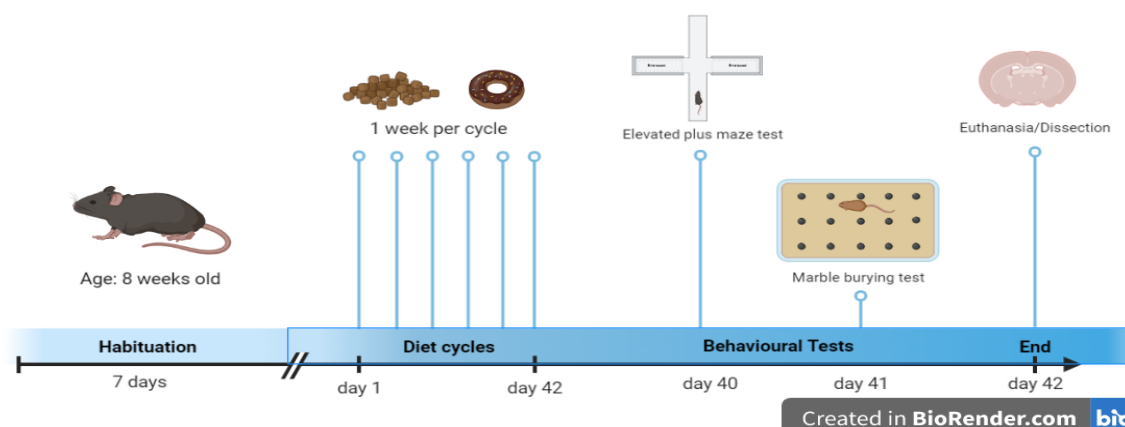


Figura 7 – Delineamento de grupo experimental:

Foram aplicados 06 ciclos de dietas alternados semanalmente. A partir dos dias 40 e 41 os animais foram submetidos a testes comportamentais: labirinto em cruz elevado (LCE) e marble burying (MB). Ao 42o. dia os animais foram eutanasiados e as áreas estudadas foram dissecadas Fonte: BioRender.

4.2.1 Tipos de dietas

Três tipos de dietas foram utilizados para compor os ciclos de dietas dos quatro grupos experimentais, sendo: Dieta Controle, Dieta Restrição e Dieta Compulsão Alimentar.

4.2.1.1 Dieta controle

O modelo da dieta controle foi composta por oferta de ração padrão (LABGOLD RC ® 20MM) composta por 60% de carboidrato, 22% de proteína e 4% lipídio, contendo 2,2 kcal por grama, com acesso *ad libitum*. A ração padrão foi fornecida pelo biotério central da UFES que a adquiriu da empresa INVIVO Nutrição e Saúde Animal Ltda ® tendo sua composição conforme a Tabela.

Tabela 1 – Composição da ração padrão**Composição Básica Ração LAB GOLD RC 20MM**

Farelo de soja, farelo de trigo, milho integral, farelo de arroz gordo, farinha de trigo, casca de ferro, sulfato de cobre, melado, dextrina, calcário, calcítico, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, monóxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, selenito de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido pantotênico, vitamina B6, ácido fólico, biotina, vitamina B12, cloreto de colina, metionina, ácido propiônico, etoxiquin, hidróxido de tolueno butilado (BHT), hidróxido de anizola butilato (BHA); espécies doadoras do gene: *Agrobacterium tumefaciens* e/ou *Arabidopsis thaliana* e/ou *Bacillus thuringiensis* e/ou *Streptomyces hygroscopicus* e/ou *Streptomyces viridochromogenes* e/ou *Zea mays*.

Fonte: INVIVO Nutrição e Saúde Animal Ltda

4.2.1.2 Dieta com restrição calórica

A restrição calórica foi baseada e modificada a partir dos estudos de Furigo et al., (2019) onde nesse estudo de restrição alimentar os animais foram submetidos à restrição alimentar ofertando apenas 40% das calorias ingeridas normalmente para um camundongo adulto durante dois dias. Porém, para o modelo de dieta restritiva deste trabalho, modificamos o protocolo para acesso a 60% da ração padrão consumida diariamente. A escolha de 60% da oferta alimentar ao invés de 40% conforme citado no referido estudo, deve-se ao fato do ciclo da dieta ser maior (sete dias ao invés de dois dias).

Durante a semana de dieta restritiva foi ofertado 60% da ração consumida habitualmente pelo grupo na caixa e ofertada diariamente às 14h. Este procedimento visava garantir o acesso diário ao alimento.

4.2.1.3 Dieta para indução de compulsão alimentar

A dieta utilizada para induzir a compulsão alimentar foi adaptada do trabalho de Corwin et al., (2011) e Smith et al., (2019). Os animais tiveram livre acesso a água e ração e foram expostos a um alimento composto de 40% de gordura e 60% de carboidratos durante dois períodos por dia, sendo a primeira exposição no período da manhã (8h às 10h) e a segunda exposição no período da tarde (14h às 16h). No presente estudo o alimento hiperpalatável escolhido foi o biscoito Oreo, marca Nabisco composto por 58% de carboidrato, 4% de proteína e 38% lipídio,

contendo 4,72 kcal por grama. A escolha do biscoito Oreo foi pela sua composição de macronutrientes ter se assemelhado com o descoberto por (SMITH et al., 2019) que constatou em seu estudo o aumento da ingestão do tipo compulsiva de alimentos compostos de aproximadamente 40% de gorduras e 60% de carboidratos, que é comumente consumido em excesso em humanos.

O consumo foi interpretado como o total de gramas consumidas ou total de calorias consumidas durante o período de dieta .

4.3 Delineamento de Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos e submetidos a diferentes dietas conforme delineamento experimental por um período de seis semanas, sendo cada semana considerada um ciclo alimentar.

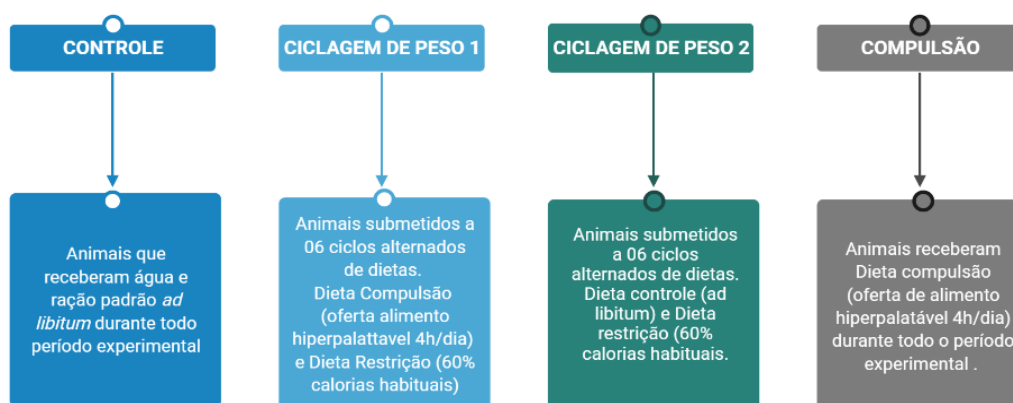


Figura 8 – Delineamento grupos experimentais. Fonte: Elaboração própria.

4.3.1 Grupo Controle

Durante as seis semanas de experimento, os animais receberam água e ração comercial *ad libitum* conforme figura 9. A ração era pesada todos os dias às 14h e a diferença entre o dia anterior e o peso atual era considerado como consumo diário. Os animais foram pesados no último dia de cada semana de dieta.

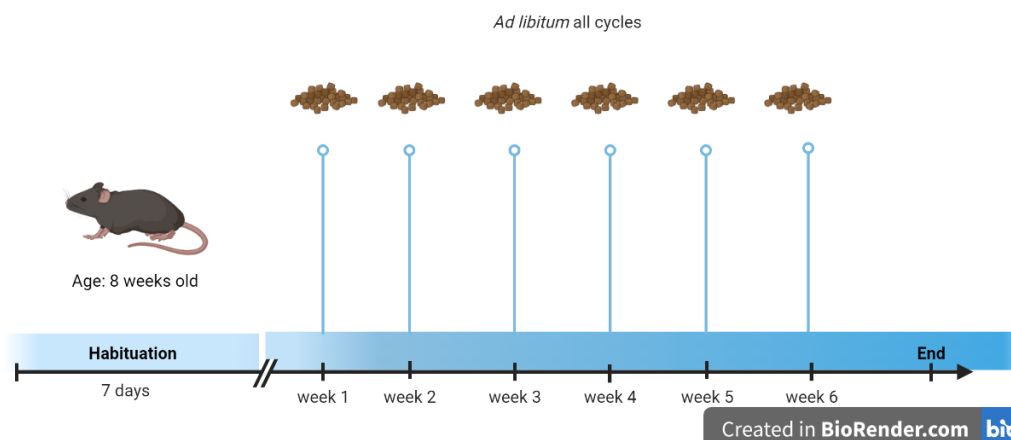


Figura 9 – Delineamento experimental ciclos alimentares- grupo controle (CTRL): Os animais foram tratados com dieta controle em todos os ciclos alimentares (seis semanas seguidas). Fonte: BioRender.

4.3.2. Grupo Ciclagem de Peso 1 (CP1) - Modelo Restrição e Compulsão

Durante o período experimental os animais tiveram seis ciclos alternados de dieta, sendo cada ciclo representado por uma semana. O primeiro ciclo iniciou-se com a restrição alimentar, alternando com ciclo de indução de compulsão alimentar conforme figura 10. Estes dois ciclos foram alternados até os seis ciclos estarem completos. A ração era pesada todos os dias às 14h e a diferença entre o dia anterior e o peso atual era considerado como consumo diário. O biscoito Oreo era ofertado duas vezes por dia (das 8h às 10h e das 14h às 16h), sendo considerado como consumo a diferença entre o peso inicial e final. Os animais eram pesados no último dia de cada ciclo alimentar.

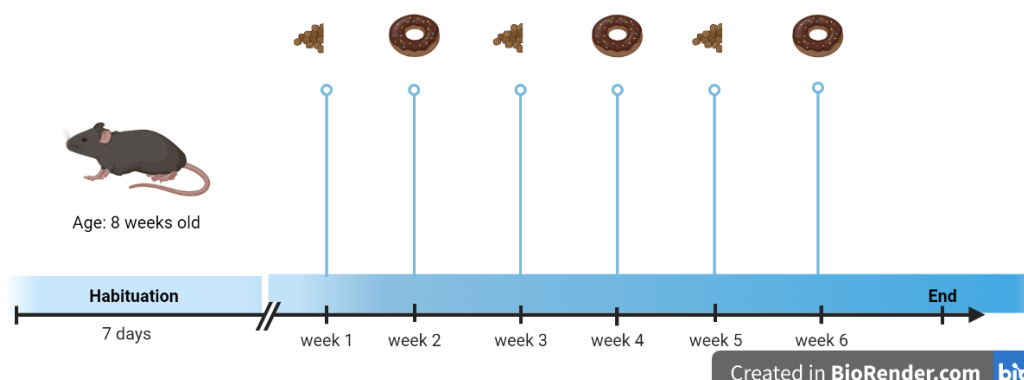


Figura 10 – Delineamento experimental ciclos alimentares *Grupo Ciclagem de Peso 1 (CP1)*: Os animais foram submetidos a ciclos alternados de dietas do tipo restrição e compulsão alimentar até completarem as seis semanas. Fonte: BioRender.

4.3.3 Grupo Ciclagem de Peso 2 (CP2) - Modelo Restrição e Controle

Durante o período experimental os animais tiveram seis ciclos alternados de dieta, sendo cada ciclo uma semana, começando com ciclo de restrição alimentar, alternando com ciclo de dieta controle (*ad libitum*) conforme figura 11. Estes ciclos foram alternados até obtermos seis ciclos completos. A ração era pesada todos os dias às 14h e a diferença entre o dia anterior e o peso atual era considerado como consumo diário. Os animais foram pesados no último dia de cada ciclo alimentar

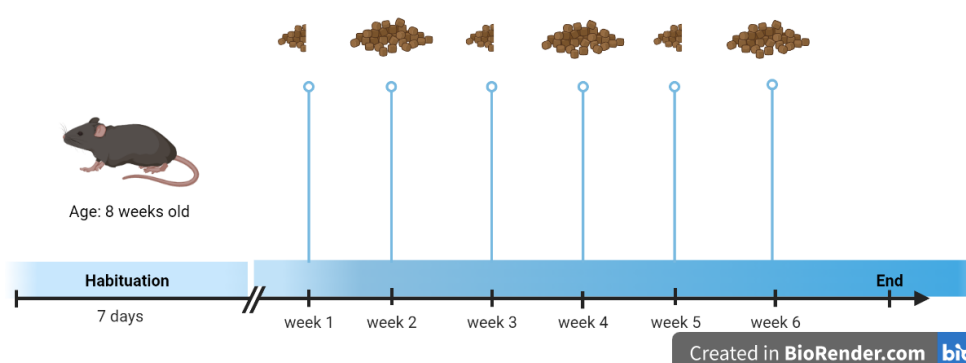


Figura 11 – Delineamento experimental ciclos alimentares grupo (CP2): Os animais foram submetidos a ciclos alternados de dieta tipo restrição e controle até completarem as seis semanas. Fonte: BioRender.

4.3.4 Grupo Modelo Compulsão Alimentar - CA

Durante o período experimental, os animais tiveram um único ciclo de indução de compulsão alimentar durante as seis semanas seguintes conforme figura 12. A ração era pesada todos os dias às 14h e a diferença entre o dia anterior e o peso atual era considerado como consumo diário. O biscoito Oreo era ofertado duas vezes por dia (das 8h às 10h e das 14h às 16h), sendo considerado como consumo a diferença entre o peso inicial e final. Os animais eram pesados no último dia de cada ciclo alimentar

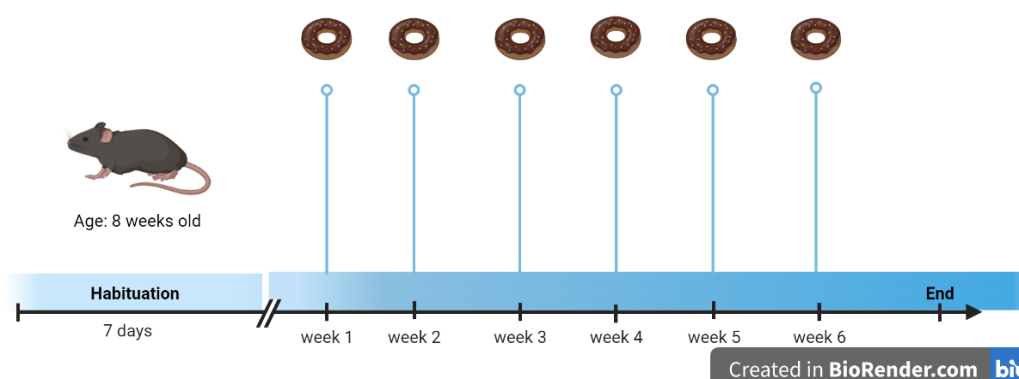


Figura 12 – Delineamento experimental ciclos alimentares grupo compulsão alimentar (CA) Os animais foram submetidos à dieta tipo compulsão alimentar durante todos os ciclos alimentares até completarem as seis semanas. Fonte: BioRender.

4.4 Avaliação do Consumo Alimentar

As quantidades de rações e do alimento hiperpalatável foram previamente pesados e colocadas diariamente na gaiola dos animais, nos períodos descritos. A diferença de peso da ração, de um dia para o outro, em g, foi dividida pelo peso total correspondente aos animais na caixa, em g. Dessa forma foi determinado o valor de consumo médio por animal da caixa, para cada dia. A soma desses valores de consumo de todos os dias de tratamento foi utilizada para determinação do consumo cumulativo.

4.5 Avaliação do Peso dos Animais

Foram investigados e comparados o ganho e perda de peso corporal. Todos os animais foram pesados no último dia de cada ciclo alimentar. A análise do peso corporal foi realizada com o objetivo de validar a ocorrência da ciclagem de peso e outras correlações com os tipos e periodicidade das dietas. Ainda, foi realizada uma avaliação do ganho de peso em porcentagem do peso do animal.

4.6 Testes Comportamentais

Para a avaliação dos comportamentos do tipo ansioso e compulsivo dos animais foram realizados os respectivos testes comportamentais para: Labirinto em Cruz Elevado e *Marble Burying*. Os testes foram realizados no dia quarenta e quarenta e um, no período da manhã (entre 10h e 12h) e da tarde (entre 14h e 17h). Os animais não passaram por nenhum tipo de mudança de rotina nos sete dias que antecederam aos testes, de modo a evitar qualquer tipo de estresse que comprometesse os experimentos. Todos os animais experimentais foram transferidos para a sala de teste de comportamento 30 minutos antes do início do primeiro teste para se habituar à condição da sala.

4.6.1 Labirinto em Cruz Elevado

No dia quarenta do período experimental os animais foram submetidos ao teste Labirinto em Cruz Elevado, procedido conforme protocolo (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008).

Fundamentalmente, este teste consistiu em colocar o animal sob um aparato composto por uma plataforma em forma de cruz na configuração de dois braços abertos (25 x 5 x 0,5 cm) um em frente ao outro e perpendiculares a dois braços fechados (25 x 5 x 16 cm), elevada a 50 cm em relação ao solo. O animal foi colocado individualmente no centro do aparato com a cabeça voltada para o braço fechado. O animal pode se mover livremente pelo labirinto por 5 minutos do sendo verificado a tendência natural de explorar o ambiente. Após cada teste, o aparato foi higienizado com álcool 70 para remoção de odores e prevenir viés de pistas olfativas.

O teste foi gravado por uma câmera de vídeo conectada a um computador utilizando o anymaze. Os vídeos foram analisados posteriormente considerando o número de entradas em cada braço e o tempo gasto nos braços abertos e fechados, utilizando essas medições como índice de comportamento semelhante à ansiedade. A permanência em um ambiente seguro, representado pelos braços fechados, condição que denota ansiogênese (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019)

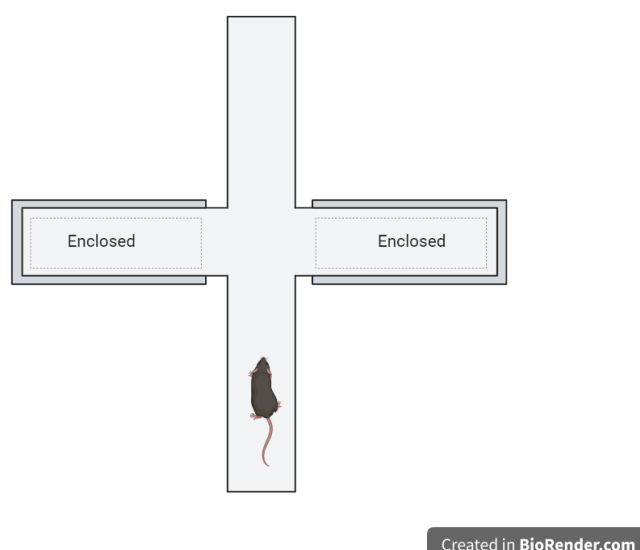


Figura 13 – Representação do Labirinto Cruz Elevado.
Fonte: BioRender

4.6.2 *Marble Burying*

No quarenta e um dia do período experimental os animais foram submetidos ao protocolo de *Marble Burying*, teste utilizado para medir comportamento do tipo compulsivo. Para esse experimento foram utilizadas caixas com medidas de 29 x 17,5 cm de comprimento, 20 esferas vítreas (bolas de gude) e maravalha. Foi colocado uma quantidade de maravalha suficiente para preencher as caixas em aproximadamente 7 cm formando uma superfície plana e compacta. Vinte esferas foram colocadas em fileiras (4 x 5) na caixa sobre a maravalha uniformemente espaçadas; cada espaço com cerca de 4 cm de distância entre as esferas. Foi colocado um animal em cada caixa e iniciado cronômetro, tempo total teste foi de 30 minutos.

A análise foi realizada após a realização dos testes através de imagem e vídeo gravado via anymaze. Foi quantificado o número de esferas enterradas e não

enterradas em quatro momentos: 10, 15, 20 e 30 minutos após início do teste. Consideramos como esfera enterrada aquelas que ficaram 2/3 de sua dimensão abaixo do nível de maravalha.



Figura 14 – Representação do protocolo *Marble Burying*. Fonte: arquivo próprio.

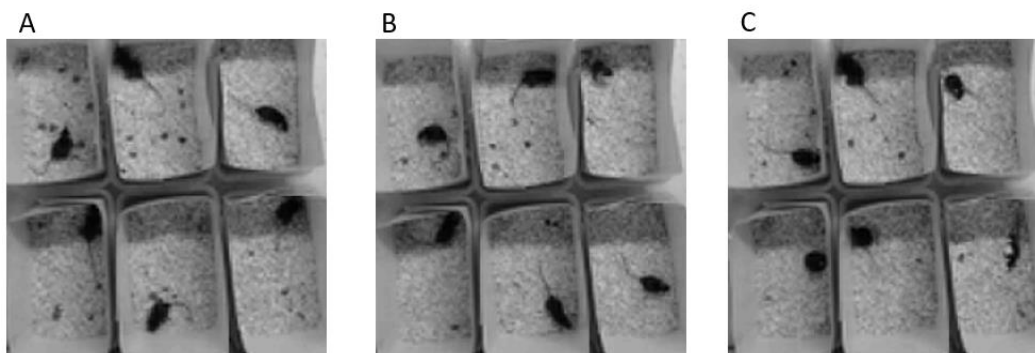


Figura 15 – Fotografia do protocolo *Marble Burying*

Legenda: Teste MB de um dos grupos experimentais (CA) observado em 10 minutos após início teste (A), após 20 minutos (B) e após 30 minutos (C). (arquivo próprio)

4.7 Determinação dos níveis proteicos do NMUR2 no Hipotálamo por Imunoblot

Ao final dos testes de comportamento, os animais foram eutanasiados por decapitação, sendo a área hipotalâmica dissecada (n=10 por grupo) e armazenada a -80°C até o processamento das amostras. Para a extração de proteínas, as amostras foram agrupadas em pool (2 hipotálamos por pool (n=5 por subgrupo), maceradas mecanicamente com tampão Ripa enriquecido com tampão de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich, St. Louis, M, USA) e centrifugadas (15000 RPM, 4°C, 15 min). O sobrenadante obtido foi estocado em alíquotas a -80°C e utilizado para a quantificação de proteínas via ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para a separação protéica por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (10%) foram utilizados 50µg de proteína. Após o fim da corrida (120V, 4°C, 2-4 horas), o conteúdo dos géis foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (90mA, 4°C, *overnight*), que posteriormente foi bloqueada (1h) com tampão de bloqueio, constituído por albumina sérica bovina 5% (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, M, USA) diluída em tampão TBS-tween (0.1%). A imunização das membranas foi realizada *overnight* utilizando um anticorpo *Rabbit Anti-NMUR2* (extracelular) (1:500) (ALOMONE LABS, Jerusalém, Israel), seguida pela lavagem com TBS-Tween (3 vezes, 5 min), incubação com anticorpo secundário *Goat-anti Rabbit* conjugado a HRP (1:3000, 2h) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e nova lavagem com TBS-Tween (3 vezes, 5 min). Os resultados foram obtidos pela revelação quimioluminescente via Kit Amersham-ECL (G&healthcare®). Por fim, as membranas foram expostas ao processo de mild-stripping por pH e novamente submetidas ao processo de bloqueio, imunização e revelação descritos, a fim de quantificar os níveis de β -actina (controle estrutural). Adicionalmente, um processo de revelação prévio da membrana foi realizado antes da incubação do anticorpo de controle, a fim de garantir que o sinal do anticorpo de interesse havia sido removido. Para a marcação da proteína estrutural, um anticorpo *rabbit anti- β -actin* (1:1000; Cell signalling) foi empregado. A quantificação da intensidade óptica das bandas foi efetuada pelo software *ImageJ* ®. Os resultados foram normalizados pela concentração de β -actina, sendo, posteriormente, obtida a percentagem relativa da concentração de NMUR2 em relação à proteína de controle.

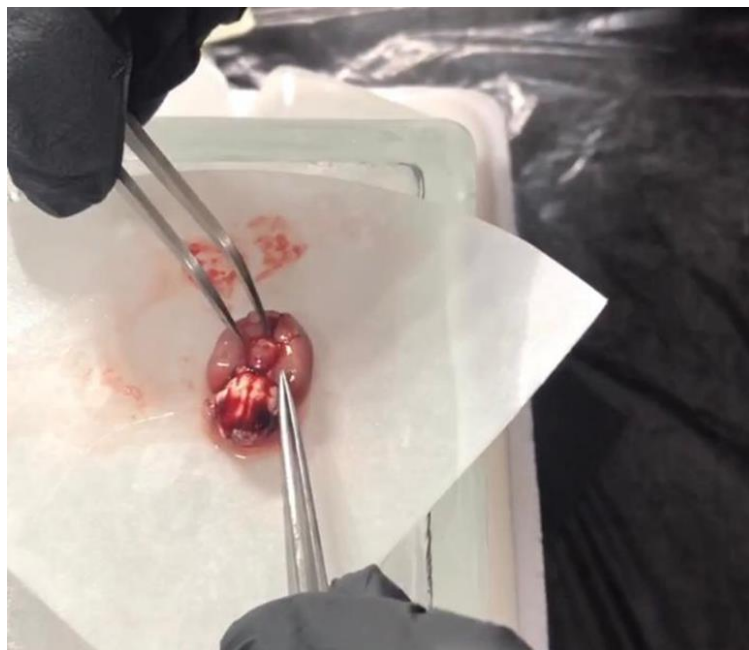


Figura 16 – Fotografia dissecação hipotálamo
Legenda: Dissecação do hipotálamo. Fonte: arquivo próprio.

4.8 Análise Estatística

Para as análises estatísticas e criação de gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8.00 para Windows (San Diego, California USA). Para analisar as diferenças comportamentais e bioquímicas foi utilizada a análise de variância ANOVA de duas vias, e quando houve diferença em algum fator independente foi realizado o teste post-hoc de Tukey. Os animais considerados *outlier* foram excluídos das análises. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ e todos os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito dos Diferentes Padrões de Dietas no Peso Corporal dos Camundongos

Com a finalidade de avaliar o peso corporal dos animais, primeiro avaliamos se os animais apresentaram uma diferença no ganho de peso comparado com o peso inicial (ver Figura 16A). Percebemos que todos os grupos apresentaram ganho de peso significativo ao término do experimento, entretanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos [efeito tratamento: $F(3,56)=2,207$; $p=0,0976$; efeito tempo: $F(1,56)=86,78$; $p=0,0001$; interação: $F(3,56)=0,3017$; $p=0,824$]. Em relação ao incremento do peso nos animais, observamos que todos os grupos estudados obtiveram um ganho de peso semelhante tanto em gramas (Figura 16B) quanto em porcentagem do peso do animal (Figura 15C) [efeito ciclagem: $F(1,57)=0,1380$; $p=0,7117$; efeito dieta: $F(1,57)=0,06475$; $p=0,8001$; interação: $F(1,57)=0,6819$; $p=0,4124$] e [efeito ciclagem: $F(1,57)=0,1867$; $p=0,6673$; efeito dieta: $F(1,57)=0,06469$; $p=0,8001$; interação: $F(1,57)=0,6918$; $p=0,4090$], respectivamente.

Ainda, foi analisado o ganho de peso no transcorrer das semanas (Figura 17). Assim, foi possível evidenciar claramente a ciclagem de ganho de peso em gramas no decorrer das semanas, nos grupos (CP1 e CP2). Nos períodos com ciclos de restrição, houve uma perda esperada de peso e nos períodos com ciclos de alimentação *ad libitum* e oferta de alimento hiperpalatável, o peso corporal foi recuperado. Dessa forma, concluímos que as dietas dos estudos foram validadas. O grupo controle e grupo CA, mantiveram o mesmo perfil de variação de ganho de peso ao longo do experimento ($p>0,05$), porém não tiveram variações alternadas superiores a 5% do peso corporal, não sendo, portanto, considerada ciclagem de peso. Por outro lado, o grupo CP1 exibiu uma perda de peso menor em relação ao grupo CP2 na terceira semana de restrição, semana 5 do experimento ($p=0,0184$). Ainda, foi constatado que o ganho de peso foi influenciado estatisticamente pelo tempo, entretanto, não pelo tratamento, contudo, houve uma diferença estatística na interação dos fatores [Efeito tempo: $F(6,342)=119,2$; $p<0,0001$; efeito do tratamento: $F(3,57)=0,276$; $p=8427$; Interação: $F(18,342)=41,15$; $p<0,0001$]. Assim, podemos observar que os ganhos de peso dos grupos CP1 e CP2 foram superiores na semana 4 em relação à semana 2.

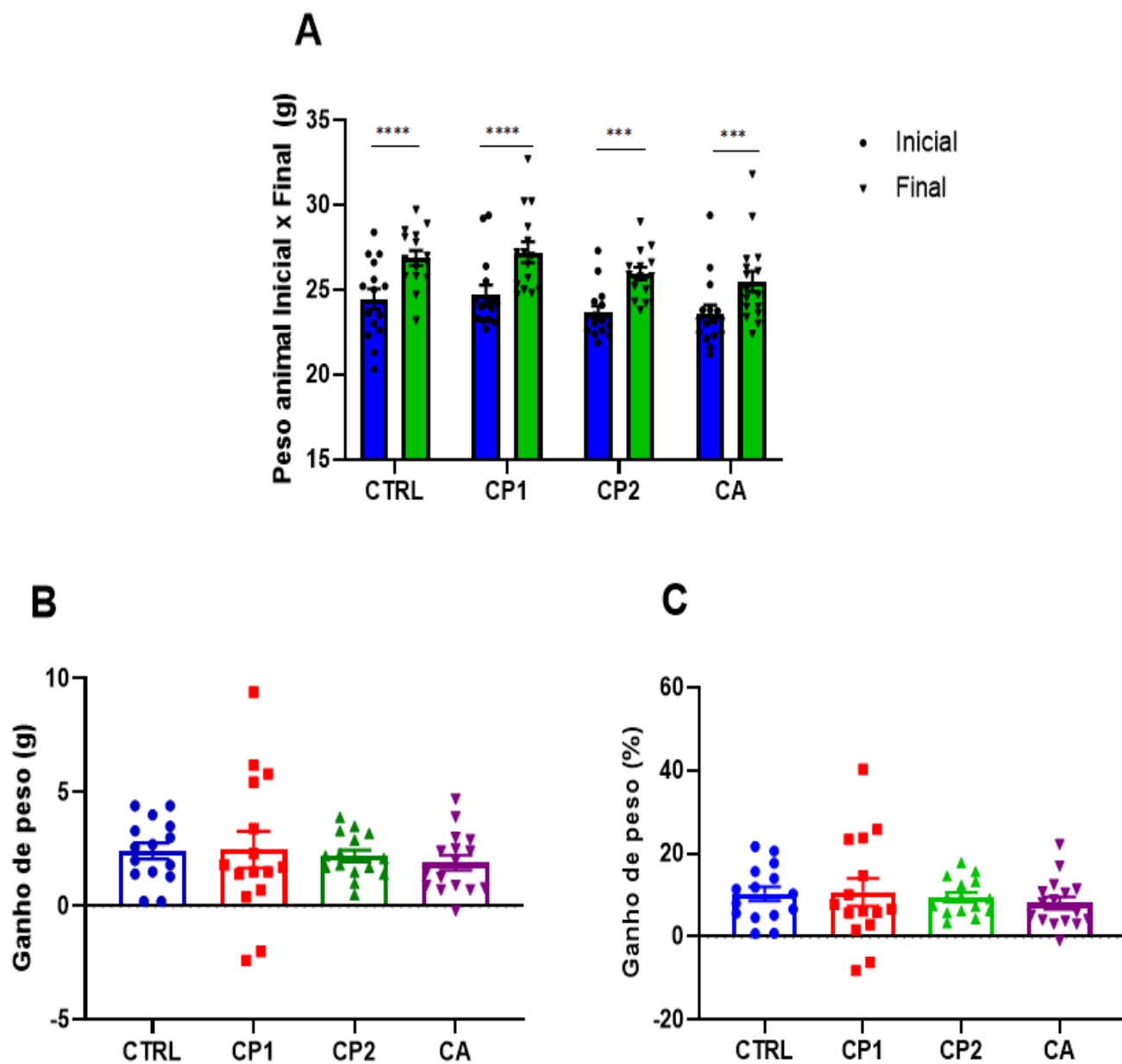


Figura 17 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre o peso do inicial vs o final (painel A) e, ganho de peso em gramas (painel B) e em porcentagem (painel C). CTRL (n=15), CP1 (n=15), CP2 (n=15) e CA (n=16), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguidas do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

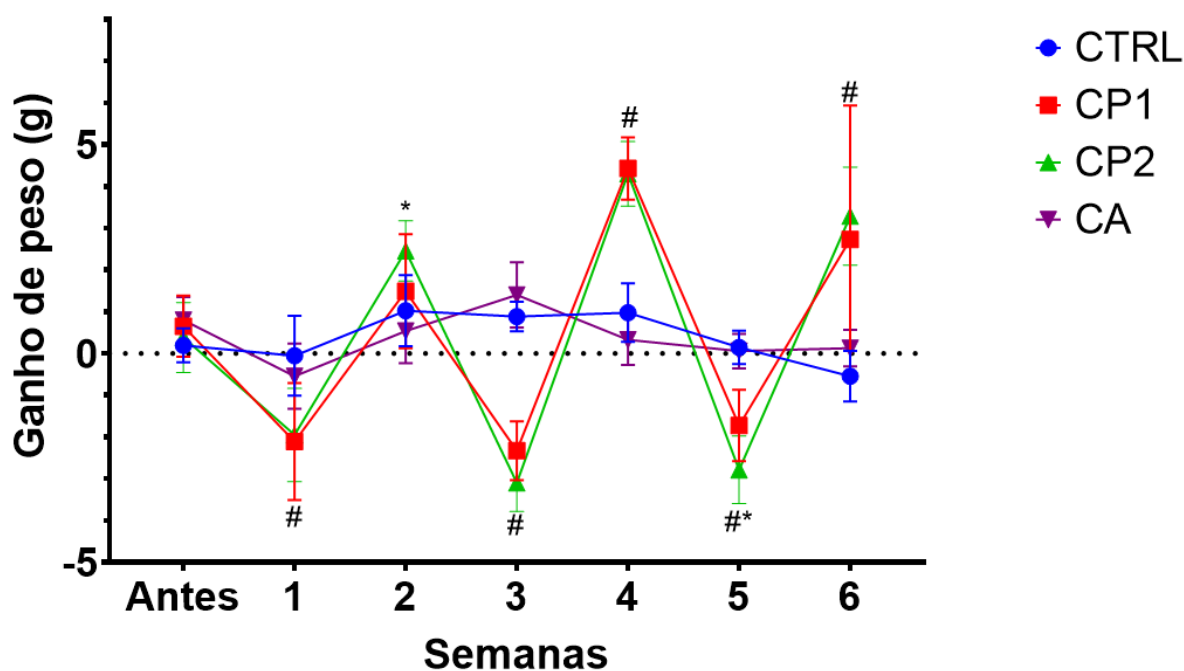


Figura 18 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre o ganho de peso do animal em gramas. CTRL (n=15), CP1 (n=15), CP2 (n=15) e CA (n=16), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguidas do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média. #diferença entre os grupos que ciclaram o peso com os sem ciclagem. * diferença entre o grupo CP1 e CP2

5.2 Efeito dos Diferentes Padrões de Dietas no Consumo Alimentar

Para avaliar o perfil de consumo alimentar, avaliamos a ingestão de ração ao longo do experimento (Figura18A) e o consumo de biscoito oreo nos grupos CP1 e CA (Figura 18B). Em relação ao consumo de ração foi observado um efeito do tempo, tratamento e interação de ambos [Efeito tempo: $F(5,285)=156,0$; $p<0,0001$; efeito do tratamento: $F(3,57)=413,8$; $p<0,0001$; Interação: $F(15,285)=108,2$; $p<0,0001$]. Sendo que, o consumo diário de ração foi diferente em todos os grupos, exceto nos grupos (CP1 e CP2) onde houve restrição alimentar, assim sendo, durante as semanas de restrição alimentar os dois grupos apresentaram um consumo semelhante de ração.

Por outro lado, o consumo de biscoito oreo também apresentou alteração ao longo do tempo, tratamento. [Efeito tempo: $F(5,145)=483,7$; $p<0,0001$; efeito do tratamento: $F(1,29)=265,3$; $p<0,0001$; Interação: $F(5,145)=372,7$; $p<0,0001$]. Além disso, foi evidenciado que os animais que ciclaram o peso (CP1) apresentaram um consumo maior de biscoito em relação ao CA nas semanas 4 e 6 do experimento ($p=0,0010$ e $p=0,0001$, respectivamente).

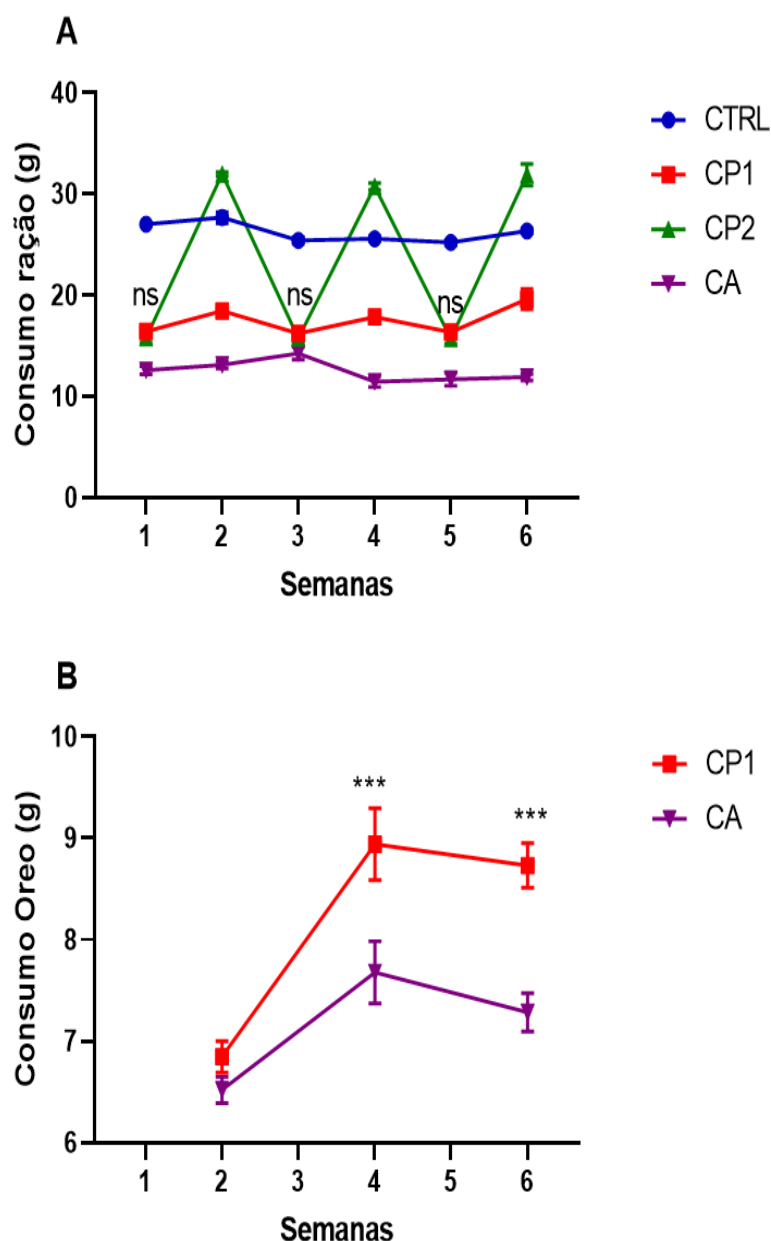


Figura 19 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre o consumo de ração (painel A) e consumo de oreo (painel B). CTRL (n=15), CP1 (n=15), CP2 (n=15) e CA (n=16), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguidas do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média. ns:-sem diferença estatística entre os grupos CP1 e CP2. *** $p<0,001$.

Ainda, avaliamos o consumo alimentar e final em Kcal (Figura 19), verificamos que animais que ciclaram o peso (CP1 e CP2) apresentaram um consumo final superior ao consumo inicial, ainda, este consumo final foi estatisticamente diferente ao grupos que não ciclaram o peso, vale destacar que o consumo final do grupo CP2 foi estatisticamente inferior ao do grupo CP1, indicando também a influência do tipo de alimento neste parâmetro [Interação: $F(3,57)=56,99$; $p<0,0001$; efeito tempo: $F(1,57)=113,2$; $p<0,0001$; efeito do tratamento: $F(3,57)=43,83$; $p<0,0001$].

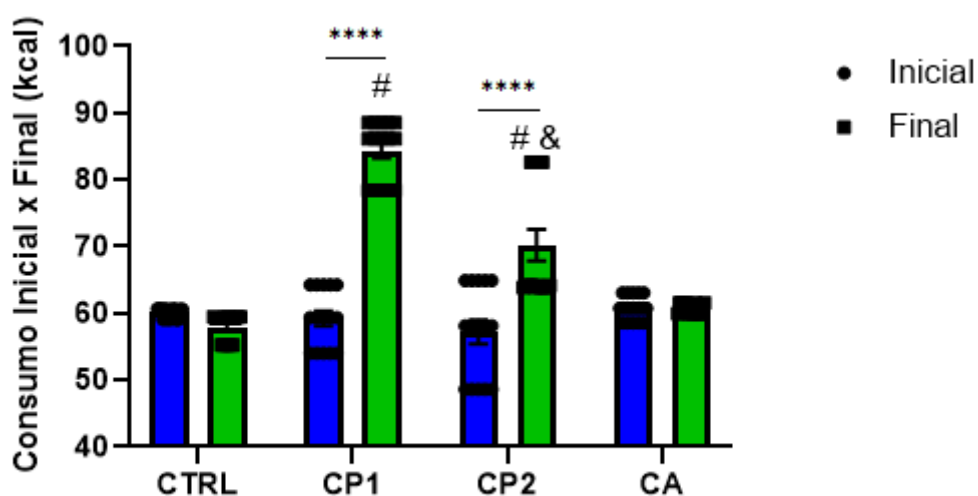


Figura 20 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre o consumo inicial e final em Kcal. CTRL (n=15), CP1 (n=15), CP2 (n=15) e CA (n=16), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguidas do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média. # diferente do controle e CA; & diferente do CP1; **** $p<0,0001$.

Em relação à eficiência alimentar, proporção de grama de peso corporal pelo consumo calórico (figura 20), foi observado que todos os grupos sofreram uma mudança da mesma ao fim do tratamento [Interação: $F(3,57)=44,2$; $p<0,0001$; efeito tempo: $F(1,57)=5,683$; $p=0,0205$; efeito do tratamento: $F(3,57)=9,069$; $p<0,0001$]. Os grupos, que ciclaram o peso, apresentaram uma eficiência menor após as 6 semanas de tratamento em comparação à inicial, enquanto os grupos que não ciclaram mostraram um perfil oposto. Sendo assim, a eficiência calórica final dos grupos que ciclaram foi inferior aos grupos sem ciclagem de peso, ainda, os animais do grupo CA, também apresentaram uma diferença estatística em relação ao grupo controle ($p=0,0242$). De forma semelhante ao observado no quesito de consumo

alimentar (Figura 20) o grupo que teve ciclagem de peso e uma dieta hiperpalatável (CP1)

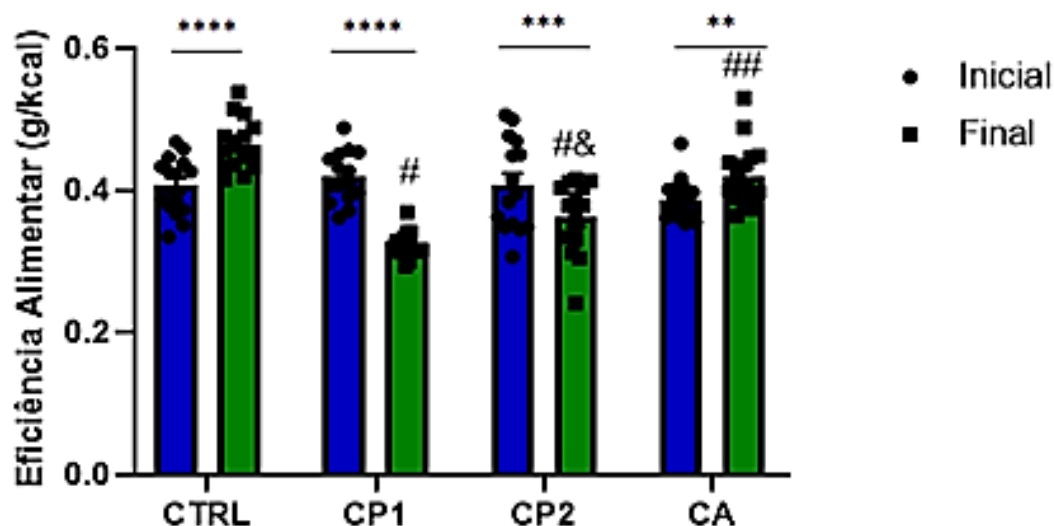


Figura 21 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre a eficiência alimentar. CTRL (n=15), CP1 (n=15), CP2 (n=15) e CA (n=16), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguidas do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média ± erro padrão da média. # diferente do controle e CA; ## diferente do controle; & diferente do CP1; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

apresentou uma eficiência calórica menor comparada ao grupo que só teve ciclagem de peso (CP2) (p=0,0443).

5.3 Efeito dos Diferentes Padrões de Dietas em um Modelo de Ansiedade

Com objetivo de avaliar o efeito dos ciclos da dieta sobre os parâmetros associados à ansiedade, foi utilizado o teste comportamental de labirinto em cruz elevado (Figura 21). A análise do tempo de exploração nos braços abertos demonstrou que não houve efeito da ciclagem de peso nem do tipo de dieta neste parâmetro [efeito ciclagem: $F(1,45)=3,147$; $p=0,0828$; efeito dieta: $F(1,45)=0,5458$; $p=0,4639$; interação: $F(1,45)=0,2185$; $p=0,6425$]. Enquanto, na exploração dos braços fechados observou-se que o grupo com ciclagem de peso e uma dieta hiperpalatável (CP1) permaneceu um maior tempo nos braços fechados em relação ao grupo com dieta hiperpalatável sem ciclagem de peso (CA) (p= 0,0408), mostrando assim um efeito do ciclo sobre este parâmetro [efeito ciclagem: F

(1,45)=6,0882; $p=0,0118$; efeito dieta: $F(1,45)=0,003442$; $p=0,9535$; interação: $F(1,45)=1,312$; $p=0,2581$] (Figura 21B).

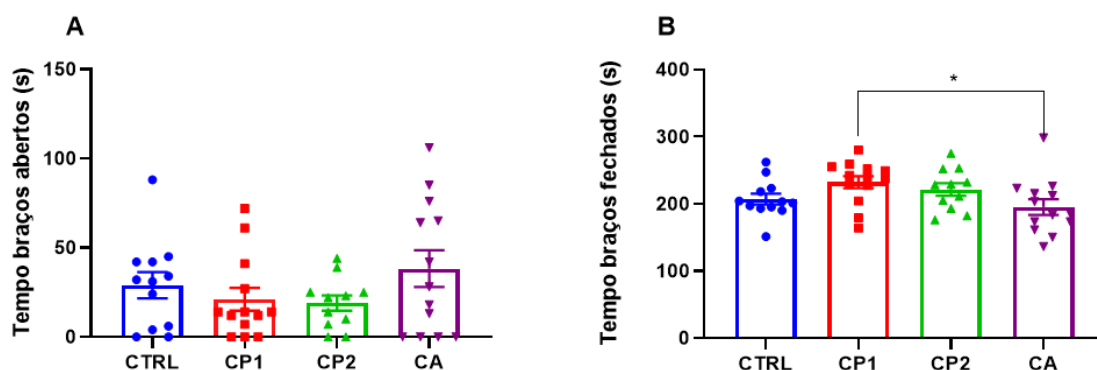


Figura 22 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre o tempo de exploração no labirinto em cruz elevado. O painel A e painel B representam o tempo de exploração dos braços abertos e fechados, respectivamente. CTRL (n=12), CP1 (n=13), CP2 (n=11) e CA (n=13), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguidas do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média. * $p=0,0408$.

5.4 Efeito dos diferentes Padrões de Dietas em um Modelo de Compulsão

Além do modelo de ansiedade, foi também avaliado o efeito dos ciclos de dieta em um modelo de compulsão, através do teste *Marble Burying*. O teste tem uma duração total de 30 minutos, contudo, a análise foi realizada de 10 em 10 minutos, visto que, ao completar o teste a maioria dos animais enterraram todas as bolinhas. Nos primeiros 10 minutos (Figura 22A) foi observado que os grupos que tiveram uma dieta hiperpalatável (CP1 e CA) enterraram um maior número de esferas em relação ao controle [efeito ciclagem: $F(1,57) = 1,819$; $p=0,1827$; efeito dieta: $F(1,57) = 17,49$; $p=0,0001$; interação: $F(1,57) = 2,007$; $p=0,1620$], sugerindo que animais expostos a uma dieta palatável apresentaram um comportamento compulsivo em relação aos animais do grupo controle ($p=0,0015$ e $0,0011$, respectivamente). Ainda, após 20 minutos de teste foi possível verificar um efeito da dieta sobre o número de esferas enterradas, entretanto nos pós teste não foi possível verificar qual grupo apresentou diferenças [efeito ciclagem: $F(1,52) = 0,001154$; $p=0,9730$; efeito dieta: $F(1,52) = 4,581$; $p=0,037$; interação: $F(1,52) = 0,2198$; $p=0,6412$]. Por último, após o término do teste, 30 minutos, não houve diferença estatísticas entre os grupos [efeito ciclagem: $F(1,52) = 0,00039$; $p=0,9842$; efeito dieta: $F(1,52) = 0,3047$; $p=0,5833$; interação: $F(1,52) = 1,324$; $p=0,2552$].

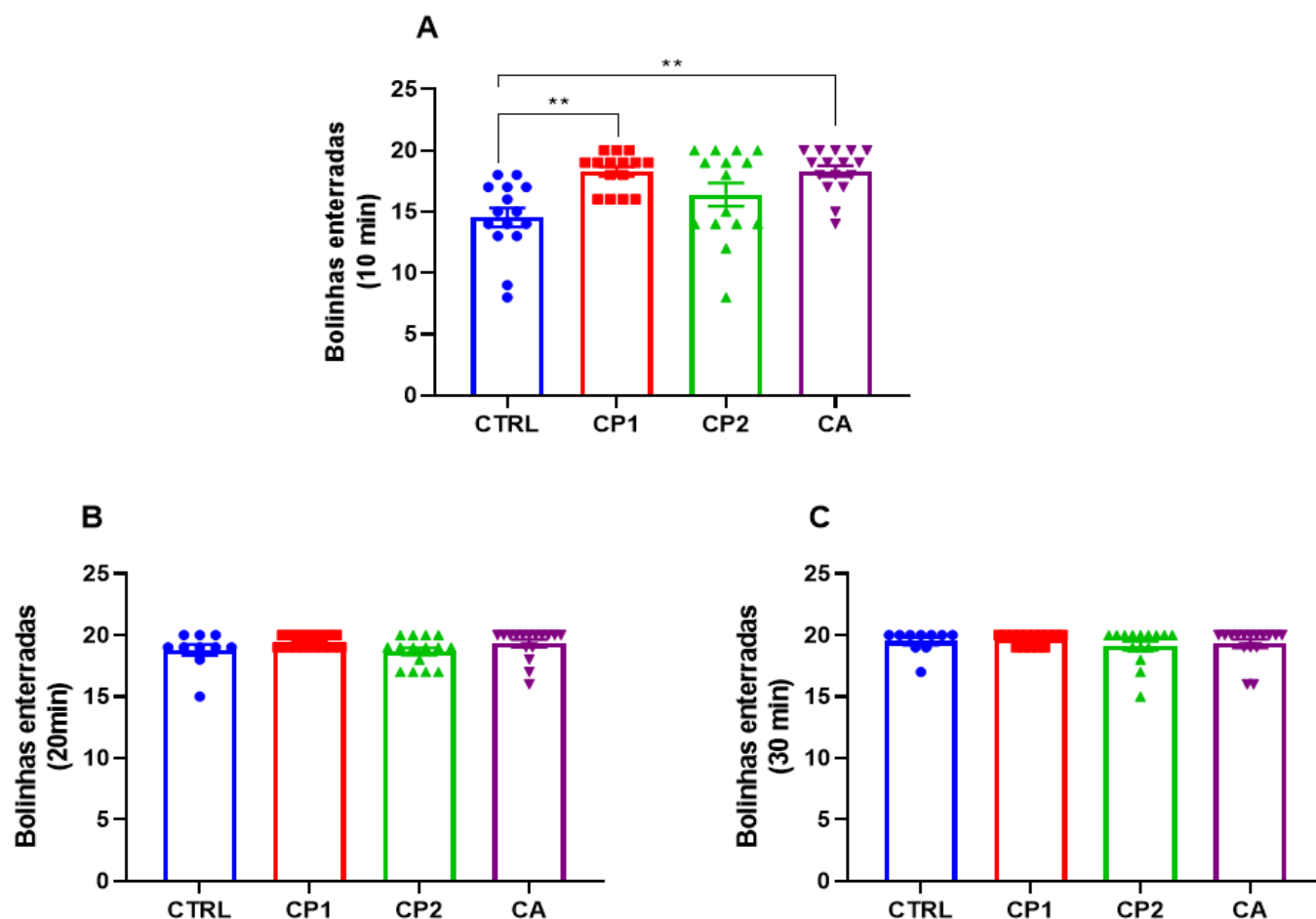


Figura 23 – Efeito da ciclagem do peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre o número de bolinhas enterradas no teste de *Marble Burying*. O número total de esferas enterradas foi avaliado durante 30 minutos, sendo este tempo dividido em blocos de 10 minutos, como mostrados no painel A, B e C, respectivamente. CTRL (n=10-15), CP1 (n=15), CP2 (n=15) e CA (n=16), através da análise de variância ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Tukey. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média. **p<0,001.

5.5 Níveis Proteicos de NMUR2 no Hipotálamo

O ensaio de imunoblot para quantificar a abundância proteica do receptor no hipotálamo nas dietas estudadas não demonstrou diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos fatores avaliados [Efeito ciclagem: $F(1,16)=0,8365$; $p=0,3740$; efeito dieta $F(1,16)=3,055$, $p=0,097$] (Figura 23).

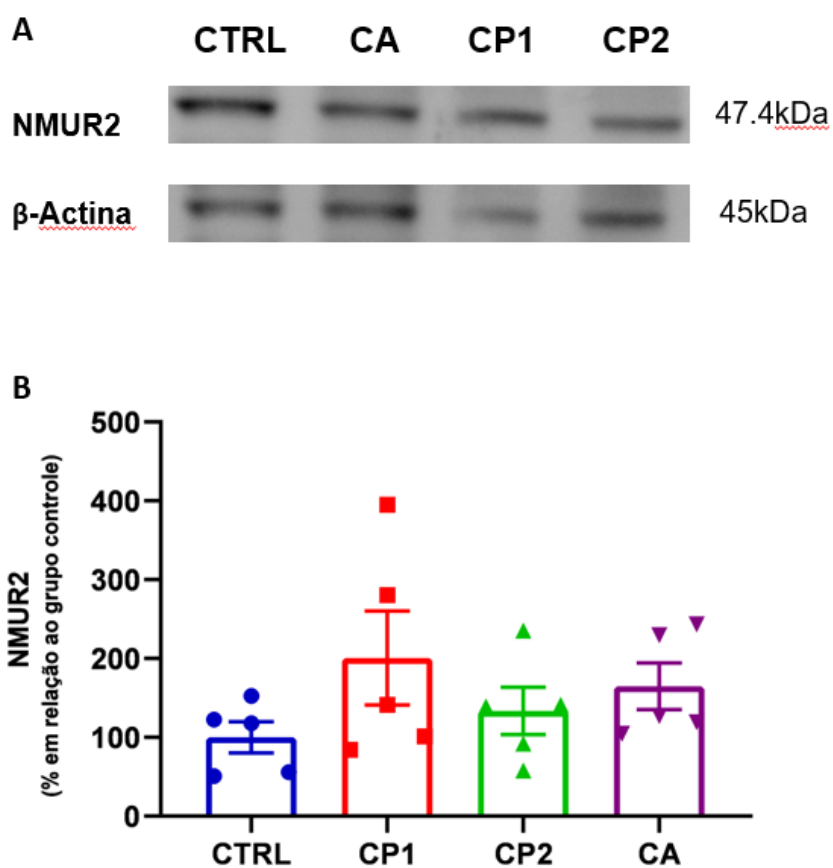


Figura 24 – Efeito da ciclagem de peso e do tipo de dieta durante 6 semanas sobre os níveis proteicos de NMUR2 hipotalâmica (A) Imagens representativas de NMUR2 e proteína da beta actina que foi utilizada como normalizador de carregamento. (B) Quantificação da densidade óptica das imagens do NMUR2 em relação a proteína constitutiva. As barras do gráfico representam a média \pm erro padrão da média; n= 5 por grupo.

6 DISCUSSÃO

Dados da literatura fornecem informações conflitantes sobre o impacto da ciclagem de peso no ganho de peso e na saúde metabólica, além de haver uma lacuna sobre as alterações neurobiológicas envolvidas na ciclagem de peso (BOSY-WESTPHAL; MÜLLER, 2014; MACKIE; SAMOCHA-BONET; TAM, 2017; NEAMAT-ALLAH et al., 2015). Portanto, este estudo se propôs a analisar o comportamento alimentar, a variação de peso corporal, o comportamento tipo ansioso e compulsivo em um modelo murino de ciclagem de peso e indução de compulsão alimentar, além de analisar se a alternância destas dietas afetaria a expressão de NMUR2 no hipotálamo. No presente estudo utilizou-se camundongos C57BL/6J machos com idade de 8 a 12 semanas (adulto jovem), os quais foram induzidos a ciclagem de peso nos grupos CP1 e CP2 durante seis semanas. Os ciclos alimentares em que as dietas restringem em 40% da quantidade de ração consumida habitualmente foram suficientes para promover perda de peso, alternadamente os ciclos alimentares *ad libitum* e indutores de compulsão alimentar promoveram recuperação/ganho de peso. Considerou-se ciclagem de peso perda e recuperação/ganho de peso conforme estabelecido em estudos anteriores (SIMONDS; PRYOR; COWLEY, 2018). Nos grupos controle e com dieta para indução de compulsão (CA), a variação de peso não foi significativa, o que significa que não houve ciclagem de peso.

O grupo CP1 teve ciclos de restrição alimentar com oferta de 60% da ração habitual e alternando com dieta para indução de compulsão alimentar que consistia na oferta de ração *ad libitum* mais oferta de alimento hiperpalatável (biscoito Oreo composição 40% gordura e 60% carboidrato) duas vezes ao dia durante duas horas (8 às 10h e 14h às 16h). O grupo CP2 teve ciclos de restrição alimentar com oferta de 60% da ração habitual alternando com ciclos de oferta de ração *ad libitum*. O modelo de indução de compulsão utilizado nos grupos CP1 e CA utilizando biscoito Oreo com composição de macronutrientes 40% gordura e 60% carboidratos foi baseado em estudos anteriores como os de (SMITH et al., 2019; CORWIN; AVENA; BOGGIANO, 2011; KASPER et al., 2014). No estudo de Smith et al. (2019) que testou o consumo de rações com várias composições 100% gordura (0% de carboidrato), 20% de gordura (80% de carboidrato) e ficou evidenciado que os animais consumiram significativamente mais gramas da mistura de 60% de gordura (40% de carboidratos). Comparativamente com humanos, os alimentos da dieta ocidental

comum contêm porcentagens de gordura que parecidas com o verificado, incluindo batatas fritas (42% de gordura), que dá contexto para as porcentagens de gordura usadas em estudos com roedores (SMITH et al., 2019). No estudo de revisão sobre modelos de compulsão em roedores descreve que acesso limitado esporádico a um alimento rico em gordura desenvolve comportamentos do tipo compulsão alimentar (CORWIN; AVENA; BOGGIANO, 2011). A preferência por alimentos ricos em gorduras também foi verificada em um estudo de “preferência por gorduras” de (KASPER et al., 2014) em que foram oferecidas uma série de diferentes alimentos com diferentes teores de gordura (12,5%, 15%, 17,5%, 20% e 45%) a ratos e foi demonstrado uma preferência significativa por alimentos com 15%, 17,5%, 20% e 45% de gordura em comparação com 12,5%, sendo a preferência por alimento com 45% de gordura estatisticamente superior a todos os demais (KASPER et al., 2014).

Após a escolha do tipo de alimento que seria ofertado para indução da compulsão, escolhemos ofertar o alimento por um período de 2h em dois momentos do dia sendo de 8h até as 10h e de 14h até às 16h, esse protocolo foi uma adaptação de modelos já utilizados em estudos anteriores (BENZON et al., 2014) em que a compulsão alimentar foi induzida por uma ração rica em gordura (45%) e ofertada por duas horas (das 18h até as 20h). Outro modelo parecido foi verificado no estudo de (SMITH et al., 2019) porém a exposição ao alimento hiperpalatável ocorreu nas primeiras 2 horas do ciclo escuro (18:00–20:00) e a segunda oferta por 2 horas perto do final do ciclo claro (14:00–16:00). Uma das principais limitações da reprodução de compulsão alimentar em modelo animal é a incapacidade de replicar todos os aspectos clínicos do TCA. Apesar da dieta ser eficiente em quantificar a ingestão de grandes volumes de alimentos em um curto espaço de tempo, ela fica limitada em não reproduzir aspectos psicológicos observados em humanos, tais como sentimento de perda de controle, vergonha e culpa que são parte do processo do ciclo vicioso que mantém a compulsão, entretanto, modelos animais são úteis para entender os mecanismos neurais subjacentes ao consumo do tipo compulsão e identificar potenciais reguladores desse comportamento específico de consumo excessivo e assim aventar novos tratamentos (SMITH et al., 2018).

Após períodos de restrição o metabolismo sofre adaptações que colaboram para a recuperação do peso (SCHOFIELD et al., 2017). No estudo de (SIMONDS; PRYOR; COWLEY, 2018) camundongos foram submetidos a ciclagem de peso

induzida por ciclos alimentares de 2 semanas alternando entre ciclo alimentar de consumo de ração com baixo teor de gordura (perdendo peso) com ciclo de consumo de ração com alto teor de gordura (ganhando peso) por um período total de 16 semanas e demonstraram que os animais que passaram por ciclos de restrição perderam menos peso a cada ciclo, ficando evidenciado o efeito da adaptação metabólica. Esperava-se que o mesmo acontecesse com os grupos CP1 e CP2, porém não apresentaram o mesmo padrão de diminuição de perda de peso a cada ciclo de restrição, mas podemos observar que os ganhos de peso dos grupos CP1 e CP2 foram superiores na semana 4 em relação a semana 2 sugerindo que adaptação metabólica não influenciou na diminuição da perda de peso, mas influenciou o ganho. Essas adaptações metabólicas provavelmente incluem a diminuição da secreção de leptina (que leva ao aumento da fome), redução dos hormônios tireoidianos (diminuição taxa metabólica basal), aumento atividade eixo HPA (aumento cortisol circulante) (OCHNER et al., 2013; SEIMON et al., 2013). Entretanto, o estudo não pode ser aprofundado nessas questões.

Analisamos se a ciclagem de peso apresentou maior ganho de peso durante o período experimental em relação aos demais grupos, porém todos os grupos mostraram um ganho de peso significativo ao término do experimento, entretanto, sem diferença estatística entre eles. Esse resultado foi semelhante ao achado por (SIMONDS; PRYOR; COWLEY, 2018) que em seu estudo demonstrou que a ciclagem de peso não foi associada com maior peso corporal. Outro estudo sobre a ciclagem de peso em modelo murino teve resultado oposto e demonstrou que existe associação entre a ciclagem de peso e ganho de peso futuro, alteração da composição corporal com aumento percentual gordura (SCHOFIELD et al., 2017.) No estudo de (SIMONDS; PRYOR; COWLEY, 2018) apesar dos animais que ciclaram peso não ganharem mais peso, houve uma capacidade diminuída de perder peso, sugerindo uma adaptação para resistir a períodos subsequentes de restrição reduzindo gasto de energia através da termogênese adaptativa.

Em relação ao consumo alimentar demonstrou-se que houve um efeito tempo, tratamento e interação entre o consumo de ração e biscoito Oreo. Nos grupos CP1 e CA em que houve consumo de biscoito Oreo ficou evidenciado que o grupo CP1 apresentou um consumo maior de biscoito em relação a CA na 4ª e 6ª semana, já que passaram por restrição calórica na 3ª e 5ª semana, demonstrando que

a redução de peso nos períodos de restrição, influenciou na preferência por alimentos mais ricos em gordura nas semanas subsequentes. Já a oferta de biscoito e ração *ad libitum* no grupo CA mostrou um consumo crescente de biscoito, porém não significativo. Esse dado mostra que a disponibilidade farta de alimentos não é o gatilho para a ingestão de alimentos hiperpalatáveis de forma compulsiva. Essa preferência por alimento rico em gordura ficou evidenciado no estudo de (SIMONDS; PRYOR; COWLEY, 2018) em que o consumo deste tipo de alimento aumentou a cada período subsequente a uma dieta restritiva. A ração com baixo teor de gordura é menos palatável do que a ração com alto teor de gordura, o que pode explicar a preferência (COTTONE et al., 2008). O aumento do valor de recompensa dos alimentos hiperpalatáveis após períodos de restrição e perda de peso pode ser explicado pela diminuição da leptina e aumento da grelina atuando no incentivo e recompensa nos circuitos neurais hedônicos via ativações dopaminérgicas do VTA para o NAc (COCCURELLO; MACCARRONE, 2018). Em humanos a ciclagem de peso também está associada a forte aumento no valor de recompensa dos alimentos hiperpalatáveis (CONTRERAS; SCHRIEVER; PFLUGER, 2019).

Na avaliação do consumo calórico os animais que ciclaram o peso (CP1 e CP2) apresentaram um consumo final estatisticamente superior ao consumo inicial, ainda, este consumo final foi estatisticamente diferente aos grupos que não ciclaram o peso. Vale destacar que o consumo final do grupo CP2 foi estatisticamente inferior ao do grupo CP1, indicando também a influência da oferta de alimento rico em gorduras que não ocorreu no grupo CP2. No estudo de (SIMONDA et al., 2018) camundongos que passaram por ciclagem de peso via alternância de ração padrão e ração rica em gordura consumiram mais alimentos quando voltavam para o consumo da dieta rica em gordura de forma crescente a cada período. Em humanos o sistema de recompensa fica alterado após a perda de peso, gerando propensão a consumir mais alimentos de alto teor calórico (OCHNER et al., 2013). Além da alteração dos níveis de leptina e grelina após a perda de peso, os níveis de GH e cortisol são aumentados e colaboram para o aumento do apetite e preferência por alimentos hiperpalatáveis com alto teor calórico (FURIGO et al., 2019; OCHNER et al., 2013; SEIMON et al., 2013).

Em relação à eficiência alimentar, que é definida como uma razão de mudança de peso corporal (g) versus a ingestão de alimentos (kcal) todos os grupos

sofreram uma mudança dela ao fim do tratamento já que todos os grupos permaneceram em gaiolas padrão sem acesso a nenhum tipo de enriquecimento para exercício voluntário. Porém, os grupos que ciclaram o peso apresentaram uma eficiência alimentar menor após as 6 semanas de tratamento em comparação à inicial, enquanto os grupos que não ciclaram mostraram um perfil oposto. Sendo assim, a eficiência calórica final dos grupos que ciclaram foi inferior aos grupos sem ciclagem de peso. O grupo que teve ciclagem de peso e uma dieta hiperpalatável (CP1) apresentou uma eficiência calórica menor comparado ao grupo que só teve ciclagem de peso (CP2) demonstrando também que o consumo de alimento rico em gorduras pode influenciar este parâmetro. Nosso resultado foi compatível com o verificado por (SIMONDS; PRYOR; COWLEY, 2018) em que camundongos obesos apresentaram eficiência alimentar diminuída após a ciclagem de peso e em comparação aos camundongos obesos com alimentação *ad libitum*. A eficiência alimentar é usualmente medida como relação do ganho peso e alimento consumido sendo que uma eficiência alimentar aumentada demonstra que são necessárias menos calorias para o mesmo ganho peso, e a eficiência alimentar diminuída demonstra que houve demanda maior de calorias para o mesmo ganho de peso, sendo então classificada como a eficiência do uso da energia consumida. Curiosamente de acordo com o que observamos na literatura sobre alterações 6wtermogênese adaptativa no metabolismo energético que aumentasse essa eficiência alimentar, ou seja, gastasse menos calorias para a manutenção ou ganho do peso (OCHNER et al., 2013; CONTRERAS; SCHRIEVER; PFLUGER, 2019).

O TCA é uma doença psiquiátrica considerada impulsiva e compulsiva associado a comorbidades tal como a ansiedade (PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Seimon et al. (2013) afirma que a restrição calórica pode aumentar a atividade do eixo HPA em humanos e animais aumentando os níveis séricos de cortisol. Por estes motivos neste trabalho avaliamos se as dietas que promoveram ciclagem de peso e/ou compulsão alimentar foram suficientes para desencadear comportamento ansioso nos camundongos. No dia 40 e 41 do período experimental todos os grupos foram submetidos ao teste LCE. Nossos resultados mostraram que o tempo de exploração nos braços abertos foi similar em todos os grupos, demonstrando que a nem a ciclagem de peso ou o tipo de dieta influenciou neste parâmetro. Porém na exploração dos braços fechados ficou demonstrado que o

grupo com ciclagem de peso e uma dieta palatável (CP1) permaneceu um maior tempo nos braços fechados em relação ao grupo com dieta palatável sem ciclagem de peso (CA) mostrando assim um efeito do ciclo sobre este parâmetro. No trabalho de Corwin et al. (2011) ficou evidenciado que camundongos com restrição calórica pode aumentar a sensibilidade a estresse, maior liberação de cortisol e uma dieta mais rica em gordura em resposta ao estresse, porém nossos dados não conseguiram validar estas associações. Existe ainda uma necessidade na literatura de estudar a relação da ciclagem de peso com comportamento ansioso, sendo o mais pesquisado até o momento a relação da obesidade e das dietas ricas em gordura com este comportamento. Yoshizaki et al (2020) avaliou se a obesidade induzida por dieta rica em gordura (HFD) apresenta um risco de distúrbios psiquiátricos e comprometimento cognitivo realizando análises comportamentais em camundongos C57BL/6J (macho, 8 semanas de idade) alimentados com HFD por 7 semanas sendo que comportamento semelhante à ansiedade, avaliado pelo teste do LCE. Os resultados sugeriram que a obesidade induzida por HFD não induz sintomas neuropsiquiátricos em camundongos C57BL/6J. Em vez disso, o HFD melhorou a memória de trabalho em camundongos C57BL/6J com menos ansiedade, indicando que um HFD pode ser benéfico sob condições limitadas. A explicação possível para o resultado do estudo de Yoshizaki são os diferentes períodos de alimentação, em seu estudo foi utilizado um período de alimentação HFD de 7 semanas, que é mais curto do que os 12 períodos relatados em estudos anteriores como o de Xu Liu et al (2018) que demonstrou que administração de uma dieta HFD no curto prazo (4 semanas) pode ter efeito ansiolítico, porém no longo prazo (12 semanas) está associado a comportamento tipo ansioso. Já os resultados de Dutheil, Sophie et al. (2016) demonstraram que a HFD de 15 a 17 semanas causa déficits comportamentais, incluindo aumento da ansiedade e anedonia. Desta forma a ausência de associação entre a dieta hiperpalatável rica em gorduras utilizadas em nosso estudo com a ansiedade pode não ter sido evidenciada por utilizarmos período de apenas 6 semanas.

A avaliação do comportamento compulsivo desencadeado pelas dietas foi realizada através do teste de enterramento de bolinhas (*Marble Burying*). Ao fim de 30 minutos de teste, todos os grupos enterraram todas as bolinhas, sendo as diferenças observadas nos primeiros 10 minutos. Os grupos que tiveram uma dieta

palatável (CP1 e CA) enterraram um maior número de esferas em relação ao controle demonstrando que animais expostos a uma dieta hiperpalatável apresentaram um comportamento compulsivo em relação aos animais do grupo controle e este comportamento não pode ser associado a ciclagem de peso, visto que o grupo CP2 não apresentou diferença estatística significativa. Nosso resultado foi compatível com o verificado por Gomes et al. (2018) cujo estudo em que o consumo crônico de uma dieta rica em gordura foi associado ao aumento do número de bolinhas enterradas, demonstrando um comportamento compulsivo, possivelmente por meio de um mecanismo associado a ativação de óxido nítrico no corpo estriado.

Neste trabalho avaliou-se a ciclagem de peso e/ou a dieta alteraram os níveis proteicos de NMUR2 no hipotálamo. A avaliação do NMUR2 já foi utilizada em outros estudos sobre compulsão alimentar sendo considerada um potencial regulador do comportamento alimentar (SAMPSON et al., 2018; SMITH et al., 2019). Em nossa avaliação da expressão de NMUR2 nos grupos experimentais, não foi observada interação dos fatores ciclagem de peso e dieta sobre a expressão de NMUR2 hipotalâmica, deste modo não foi possível associar esse tipo de alteração neurobiológica em decorrência das dietas que ciclam peso ou induzem compulsão alimentar.

A análise dos níveis proteicos do NMUR2 no hipotálamo foi baseada em estudos anteriores que descreveram o papel deste receptor no PVN como estimulador do eixo hipotálamo-hipófise- adrenal e inibidor da alimentação (WREN et al., 2002). Seu estudo demonstrou que a inibição da ingestão alimentar aconteceu de forma dose dependente com injeção de NMU em áreas do hipotálamo. Para localizar em qual núcleo hipotalâmico o NMU teria ação anoréxica, solução salina e NMU foram injetados em núcleos hipotalâmicos específicos de ratos em jejum. Foi então comparado a ação do NMU correlacionando com a ingestão ou inibição alimentar. A microinjeção de NMU no PVN causou inibição da alimentação na hora seguinte para 59% em comparação com controle e no ARC 76% em comparação com controle. Nenhuma inibição imediata da alimentação foi observada após a injeção de NMU em qualquer uma das outras áreas hipotalâmicas como AHA, LHA, DMN e VMN (WREN et al., 2002). Outro achado de WREN et al. (2002) foi de que a leptina estimula a liberação de NMU no hipotálamo. Esses dados juntos sugerem que a liberação de

NMU pode ser estimulada pela leptina e a síntese de NMU pode ser inibida na sua ausência como seria esperado para sinalização de saciedade.

Nosso estudo analisou os níveis proteicos no NMUR2 e não foi possível avaliar a expressão do gene NMUR2, porém no estudo de Benzoni et al. (2014), demonstrou que a eliminação seletiva de NMUR2 no PVN de ratos aumentou a sensibilidade às propriedades reforçadoras dos alimentos, resultando em aumento da ingestão e preferência por alimentos obesogênicos ricos em gordura (fator dieta). Eles utilizaram RNAi mediado por vírus para inibir seletivamente a expressão do gene NMUR2 no PVN demonstrando que em ratos alimentados com ração padrão, a diminuição da expressão de mRNA de NMUR2 (knockdown) não produziu efeito significativo na ingestão de alimentos ou no peso corporal, porém quando os mesmos ratos foram alimentados com uma dieta rica em gordura (45% de gordura), eles consumiram significativamente mais alimentos, ganharam mais peso corporal, aumentaram a eficiência alimentar e demonstraram comportamento alimentar compulsivo em relação aos controles, através da diminuição da sinalização na via da recompensa (BENZONI et al., 2014). Outro estudo de (SMITH et al., 2019) demonstrou uma forte correlação positiva de NMUR2 no NAc com a ingestão compulsiva de uma mistura “mais baixa” de gordura (mais carboidratos), enquanto NMUR2 no VTA demonstrou uma forte correlação negativa com a ingestão excessiva de uma mistura “extrema” de alto teor de gordura (0% carboidrato). Esses dados sugerem que NMUR2 pode regular diferencialmente a compulsão alimentar dentro do NAc e do VTA (SMITH et al., 2019).

Baseado em estudos anteriores (BENZONI et al., 2014; SMITH et al., 2019) e nos resultados obtidos neste estudo, pelo aumento de consumo do alimento hiperpalatável rico em gorduras e aumento do consumo valor calórico nos grupos que ciclaram peso, esperava-se uma diminuição da expressão do NMUR2 no hipotálamo nos grupos CP1 e CP2. Sugere-se, portanto, que estudos adicionais sobre outros mecanismos envolvidos na ciclagem devem ser aventados para uma elucidação sobre quais alterações neurobiológicas estariam alteradas nessas dietas, podendo assim aumentar o arsenal de possíveis alvos terapêuticos disponíveis para a clínica.

7 CONCLUSÃO

Partindo da hipótese de que a ciclagem de peso é capaz de alterar os comportamentos alimentares, comportamentos do tipo ansioso e compulsivo e que essas alterações afetariam os níveis proteicos do NMUR2 no hipotálamo, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que:

- 1) O modelo utilizado para a ciclagem de peso foi validado nos grupos CP1 e CP2. Os ciclos alimentares onde foram utilizadas dieta restrição de 40% da quantidade de ração consumida habitualmente foram suficientes para promover perda de peso, alternadamente os ciclos alimentares *ad libitum* e indutores de compulsão alimentar promovem recuperação/ganho de peso.
- 2) Todos os grupos apresentaram ganho de peso significativo ao término do experimento; entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos demonstrando que os ciclos de dietas não influenciaram neste parâmetro.
- 3) Animais que ciclaram peso e tiveram acesso ao consumo de alimento hiperpalatável (CP1) apresentaram um consumo maior de biscoito no decorrer do tempo em comparação com animais que consumiram alimento hiperpalatável (Oreo) e não ciclaram peso. Isto evidencia uma correlação da ciclagem de peso com a preferência por alimentos ricos em gordura.
- 4) A eficiência alimentar foi diminuída nos grupos que apresentaram ciclagem de peso, CP1 e CP2, enquanto nos grupos controle e CA foi aumentada.
- 5) A ciclagem de peso está associada ao aumento do consumo calórico no período final em relação ao período inicial do experimento.
- 6) Animais submetidos a ciclagem de peso e dieta hiperpalatável (CP1) apresentaram comportamento tipo ansioso em relação aos animais que só foram expostos à dieta hiperpalatável (CA).
- 7) Animais expostos a uma dieta hiperpalatável apresentaram um comportamento compulsivo em relação aos animais do grupo controle.
- 8) Em nossos experimentos, não foram encontradas evidências da interação dos fatores ciclagem de peso e tipo de dieta sobre os níveis proteicos de

NMUR2 hipotalâmico. O nível proteico de NMUR2 no hipotálamo não foi alterada pelas dietas que induziram ciclagem peso ou compulsão alimentar.

REFERÊNCIAS

BENZON et al., (2014). Neuromedin U receptor 2 knockdown in the paraventricular nucleus modifies behavioral responses to obesogenic high-fat food and leads to increased body weight. **Neuroscience**, 258, 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.023>

BOSY-WESTPHAL, A. et al. (2015). Deep body composition phenotyping during weight cycling: Relevance to metabolic efficiency and metabolic risk. **Obes Ver.** Doi: [10.1111/obr.12254](https://doi.org/10.1111/obr.12254)

BOSY-WESTPHAL; MÜLLER, (2014) Measuring the impact of weight cycling on body composition: a methodological challenge. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014 Sep;17(5):396-400. doi: 10.1097/MCO.000000000000092. PMID: 25010545.

COCCURELLO, R.; MACCARRONE, M. (2018) Hedonic eating and the “delicious circle”: From lipid-derived mediators to brain dopamine and back. **Front Neurosci** 12:271. Doi: [10.3389/fnins.2018.00271](https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00271)

CONTRERAS, R.E.; SCHRIEVER, S.C.; PFLUGER, P.T. (2019) Physiological and Epigenetic Features of Yoyo Dieting and Weight Control. **Front Genet** 10:1015. Doi: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffgene.2019.01015>

CONSIDINE, R.V.; CARO, J.F. (1996) Leptin in humans: current progress and future directions. **Clin Chem**, 42(6 Pt 1):843-4. Doi: <https://doi.org/10.1093/clinchem/42.6.843>

CORDÁS, T.A.; KACHANI, A.T. **Nutrição em psiquiatria**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CORWIN, R.L.; AVENA, N.M.; BOGGIANO, M.M. (2011) Feeding and reward: Perspectives from three rat models of binge eating. **Physiol Behav**, 104(1):87–97. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.041>

COTTONE et al.,(2008), Consummatory, anxiety-related and metabolic adaptations in female rats with alternating access to preferred food. **Psychoneuroendocrinology**. 2009 Jan;34(1):38-49. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.08.010. Epub 2008 Oct 8. PMID: 18842344; PMCID: PMC3224792.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. (2004) Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends Immunol**, 25(1):4-7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.10.013>.

DE CEGLIA et al., (2021) Obesity as a Condition Determined by Food Addiction: Should Brain Endocannabinoid System Alterations Be the Cause and Its Modulation the Solution? *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Sep 29;14(10):1002. doi: 10.3390/ph14101002. PMID: 34681224; PMCID: PMC8538206.

DINGEMANS, A.; DANNER, U.; PARKS, M. (2017) Emotion regulation in binge eating disorder: A review. **Nutrients** 9(11):1274. Doi: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fnu9111274>.

Dutheil, Sophie et al. "High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* vol. 41,7 (2016): 1874-87. doi:10.1038/npp.2015.357

FISCHER, I. P. et al. (2018) A history of obesity leaves an inflammatory fingerprint in liver and adipose tissue. **Int J Obes** 42(3):507–517. Doi: <https://dx.doi.org/10.1038%2Fijo.2017.224>

FURIGO, I. C. et al. (2019) Growth hormone regulates neuroendocrine responses to weight loss via AgRP neurons. **Nat Commun**, 10(1):662. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08607-1>.

FURLONG et al., (2014) Binge-like consumption of a palatable food accelerates habitual control of behavior and is dependent on activation of the dorsolateral striatum. *J Neurosci*. 2014 Apr 2;34(14):5012-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3707-13.2014. PMID: 24695718; PMCID: PMC6802720.

GOMES, J et al. (2018) A high-refined carbohydrate diet facilitates compulsive-like behavior in mice through the nitric oxide pathway. **Nitric Oxide**, 80:61–69. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.08.008>

GONZÁLEZ-MUNIESA et al., (2017) Obesity. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jun 15;3:17034. doi: 10.1038/nrdp.2017.34. PMID: 28617414.

GUYTON, AC **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. GANONG, WF *Fisiologia médica*. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2006. AIRES, MM *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

JARDIM, A.T. (2019) Impacto da ciclagem de peso na saúde: revisão integrativa. *Revista Uningá*, 56(1):85-90.

YOSHIZAKI, Kaichi et al. "High-Fat Diet Enhances Working Memory in the Y-Maze Test in Male C57BL/6J Mice with Less Anxiety in the Elevated Plus Maze Test." *Nutrients* vol. 12,7 2036. 9 Jul. 2020, doi:10.3390/nu12072036

KAKINAMI, L.; KNAÜPER, B.; BRUNET, J. (2020) Weight cycling is associated with adverse cardiometabolic markers in a cross-sectional representative US sample. **J Epidemiol Community Health** 74(8): 662–667. Doi: <https://dx.doi.org/10.1136%2Fjech-2019-213419>.

KASPER et al., (2014) Fat Preference: a novel model of eating behavior in rats. *J Vis Exp*. 2014 Jun 27;(88):e51575. doi: 10.3791/51575. PMID: 24998978; PMCID: PMC4206181.

- KEEN-RHINEHART, E.; ONDEK, K.; SCHNEIDER, J.E. (2013) Neuroendocrine regulation of appetitive ingestive behavior. **Front Neurosci**, 7:213. Doi: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffnins.2013.00213>.
- KESSLER, R. M. et al. (2016) The neurobiological basis of binge-eating disorder. **Neurosci Biobehav Rev** 63:223-38. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.01.013>.
- KIRCHNER, H. et al. (2012) Caloric restriction chronically impairs metabolic programming in mice. **Diabetes**, (11):2734-42. Doi: <https://doi.org/10.2337/db11-1621>.
- KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. (2008) Elevated plus maze for mice. **J Vis Exp**, 22:1088. Doi: <https://dx.doi.org/10.3791%2F1088>.
- KOPELMAN, P. (2007) Health risks associated with overweight and obesity. **Obes Ver** 1:13-7. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1467-789x.2007.00311.x>.
- KRAEUTER, A.K.; GUEST, P.C.; SARNYAI, Z. (2019) The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. **Methods Mol Biol**, 1916:69-74. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4.
- MACKIE, G.M.; SAMOCHA-BONET, D.; TAM, C.S. (2017) Does weight cycling promote obesity and metabolic risk factors? **Obes Res Clin Pract** 11(2):131-139. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2016.10.284>.
- MOORE, C. F. et al. (2017) Neuroscience of compulsive eating behavior. **Front Neurosci**, 11:469. Doi: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffnins.2017.00469>.
- MORTON, G.J.; MEEK, T.H.; SCHWARTZ, M.W. (2014) Neurobiology of food intake in health and disease Nature. **Nat Rev Neurosci**, 15(6):367-78. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrn3745>
- MURRAY, S. et al. (2014) Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. **Nat Rev Endocrinol**, 10(9):540-52. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.91>
- NARAYANAN, N.S.; GUARNIERI, D.J.; DILEONE, R.J. (2010) Metabolic hormones, dopamine circuits, and feeding. **Front Neuroendocrinol**, 31(1):104. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.yfrne.2009.10.004>
- NEAMAT-ALLAH, J. et al. (2015) Weight cycling and the risk of type 2 diabetes in the EPIC-Germany cohort. **Diabetologia**, 58(12):2718-. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3755-9>
- NOVELLE, M. G.; DIÉGUEZ, C. (2018) Food addiction and binge eating: Lessons learned from animal models. **Nutrients**, 10(1):71 Doi: <https://doi.org/10.3390/nu10010071>

OCHNER, C. N. et al. (2013) Biological mechanisms that promote weight regain following weight loss in obese humans. **Physiol Behav**, 120:106-13. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.07.009>

PEIER et al., (2009) The antiobesity effects of centrally administered neuromedin U and neuromedin S are mediated predominantly by the neuromedin U receptor 2 (NMUR2). *Endocrinology*. 2009 Jul;150(7):3101-9. doi: 10.1210/en.2008-1772. Epub 2009 Mar 26. PMID: 19324999; PMCID: PMC2703546.

PSYCHIATRIC ASSOCIATION, A. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5 - 5ª Edição**. Porto Alegre:Artmed, 2014. Disponível em: <http://www.niip.com.br/wp-content/uploads/2018/06/Manual-Diagnostico-e-Estatistico-de-Transtornos-Mentais-DSM-5-1-pdf>

RIBEIRO, G.; SANTOS, O. (2013) Food Reward: mechanisms involved and implications for obesity. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 8(2):82-88.

RUBINO, F. et al. (2020) Joint international consensus statement for ending stigma of obesity. **Nat Med**, 26(4):1-13. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0803-x>.

SAMPSON, C.M. et al. (2018) Small-Molecule Neuromedin U Receptor 2 Agonists Suppress Food Intake and Decrease Visceral Fat in Animal Models. **Pharmacol Res Perspect**, 6(5):e00425. Doi: <https://doi.org/10.1002/prp2.425>.

SCHOFIELD, S.E. et al. (2017) Metabolic dysfunction following weight cycling in male mice. **Int J Obes**, 41(3):402-411. Doi: <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.193>.

SEIMON, R.V. et al. (2013) Effects of energy restriction on activity of the hypothalamo-pituitary- adrenal axis in obese humans and rodents: Implications for diet-induced changes in body composition. **Horm Mol Biol Clin Investig**, 15(2):71-80. Doi: <https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0038>

SIMONDS; PRYOR; COWLEY, (2018) Repeated weight cycling in obese mice causes increased appetite and glucose intolerance. *Physiol Behav*. 2018 Oct 1;194:184-190. doi: 10.1016/j.physbeh.2018.05.026. Epub 2018 May 26. PMID: 29842854.

SMITH et al., (2018) Weight Cycling Increases Longevity Compared with Sustained Obesity in Mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2018 Nov;26(11):1733-1739. doi: 10.1002/oby.22290. PMID: 30358151; PMCID: PMC6221135.

SMITH, A. E. et al. (2019) Binge-type eating in rats is facilitated by neuromedin U receptor 2 in the nucleus accumbens and ventral tegmental area. **Nutrients**, 11(2):327. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu11020327>.

SUYAMA, S.; YADA, T. (2018) New insight into GABAergic neurons in the hypothalamic feeding regulation. **J Physiol Sci**, 68(6):717-722. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12576-018-0622-8>

TERANISHI, H.; HANADA, R. (2021) Neuromedin U, a key molecule in metabolic disorders. **Int J Mol Sci**, 22(8):4238. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22084238>

VALLÖF, D.; KALAFATELI, A.L.; JERLHAG, E. (2020) Brain region-specific neuromedin U signalling regulates alcohol-related behaviours and food intake in rodents. **Addic Biol**, 25(3):e12764. Doi: <https://doi.org/10.1111/adb.12764>

WATTEYNE, J. et al. (2020) Neuromedin U signaling regulates retrieval of learned salt avoidance in a *C. elegans* gustatory circuit. **Nat Commun**, 11(1):2076 . Doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15964-9>

WHARTON, S. et al. (2020) Obesity in adults: A clinical practice guideline. **CMAJ**, 192:E875–E891. Doi: <https://doi.org/10.1503/cmaj.191707>

WILCOX, G. (2005) Insulin and Insulin Resistance. **Clin Biochem Ver**, 26(2):19-39. Doi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1204764/>

YEUNG; SHI; SUNG, (2021) Physiological Responses of Post-Dietary Effects: Lessons from Pre-Clinical and Clinical Studies. *Metabolites*. 2021 Jan 20;11(2):62. doi: 10.3390/metabo11020062. PMID: 33498462; PMCID: PMC7909542.

Xu, Liu et al. "High-fat Diet Mediates Anxiolytic-like Behaviors in a Time-dependent Manner Through the Regulation of SIRT1 in the Brain." *Neuroscience* vol. 372 (2018): 237-245. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.01.001

Sites acessados

Obesity and overweight. **World Health Organization**, 9 de junho de 2021. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> Acesso em: 15 de março de 2022.

The State of Food Security and Nutrition in the World 2019: Safeguarding against Economic Slowdowns and Downturns. FAO, IFAD, UNICEF, WFP & WHO. 15 de julho de 2019. Disponível em: <https://reliefweb.int/report/world/state-food-security-and-nutrition-world-2019-safeguarding-against-economic-slowdowns> Acesso em: 15 de março de 2022.

APÊNDICE A – Aprovação do Estudo pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Espírito Santo



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da expressão do receptor do tipo 2 da neuromedina U na via mesolímbica em modelo murino de ciclagem de peso e compulsão alimentar**

Registrada sob o n.º 45/2019

sob a responsabilidade de **CRISTINA MARTINS E SILVA**

que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia 04 de outubro de 2019

Vigência da autorização: outubro/2019 a julho/2023

Finalidade: Pesquisa

Espécie(s): Camundongo (*Mus musculus*)

Linhagem(ns)/raça(s): C57Bl6J

Peso: 25-30 gramas

Idade: 08-12 semanas

Sexo: Macho

Número de animais: 104

Origem: Biotério Central, Centro de Ciências da Saúde, Campus Maruípe, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES

Vitória-ES, 04/10/2019

Breno S. Salgado

Breno Souza Salgado

Coordenador da CEUA-Ufes

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Avenida Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória/ES – CEP 29043-910 - Telefone: (27) 3335-7026 – ceua@ufes.br – www.ceua.ufes.br