

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO**



TÁSSIA KARIN FERREIRA BORBA

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NUCLEARES DE GLICOCORTICOIDES E
REV-ERB α COM O BALANÇO ENERGÉTICO DE RATOS WISTAR**

Recife, 2017

TÁSSIA KARIN FERREIRA BORBA

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NUCLEARES DE GLICOCORTICOIDES E
REV-ERB α COM O BALANÇO ENERGÉTICO DE RATOS WISTAR.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento do Centro de Ciências da Saúde da Universidade federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

Co-orientador: Prof. Dr. Omar Guzman-Quevedo

Recife, 2017

B726e Borba, Tássia Karin Ferreira.
Envolvimento dos receptores nucleares de glicocorticoides e REV-ERBa com o balanço energético de ratos wistar / Tássia Karin Ferreira Borba. – 2017.
182 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Raul Manhães de Castro.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Ritmo Circadiano. 2. Glicocorticoides. 3. Consumo alimentar. 4. Metabolismo energético. I. Castro, Raul Manhães de (Orientador). II. Título.

612.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2017-205)

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO**

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NUCLEARES DE GLICOCORTICOIDES E
REV-ERB α COM O BALANÇO ENERGÉTICO DE RATOS WISTAR.**

Tese aprovada em 14 de março de 2017.

Banca examinadora:

Prof^a. Ana Elisa Toscano

(Departamento de Enfermagem – CAV – UFPE)

Prof^a. Raquel Aragão da Silva

(Departamento de Educação Física e Ciências do Esporte – CAV – UFPE)

Prof^a. Kelli Nogueira Ferraz Pereira Althoff

(Departamento de Educação Física e Ciências do Esporte – CAV – UFPE)

Prof. José Luiz de Brito Alves

(Departamento de Nutrição – UFPB)

Prof. Omar Guzman-Quevedo

(Facultad de Químico-Farmacobiología - Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,
Michoacán, México.)

Aos meus pais, Tenilda Ferreira Borba da Silva e José Borba da Silva e ao meu irmão José Borba da Silva Júnior.

A muito descobrir que recebi o maior presente que eu poderia receber da vida, em um planeta “mar de gente” e tão antigo, tive a oportunidade de nascer exatamente como filha e irmã de vocês. Entre nós há o que considero a maior nobreza que eu poderia receber e construir. Se os pais as vezes não sabem se seus ensinamentos prepararam seus filhos, saibam que me sinto fortalecida e acalentada não só pela presença, mas pelo que eu levo e jamais esquecerei de vocês, até nos mínimos gestos do dia a dia.

Dedico-lhes o trabalho que é resultando também do trabalho de vocês.

Agradecimentos

Aos meus pais, **Tenilda Borba** e **José Borba**, meus grandes amigos e representação de força e dos melhores atributos apresentados por um ser humano. Obrigada por tudo, por saberem doar como mestres o que não receberam da vida!

Ao meu irmão, **José Borba Junior**, a quem agradeço tanto pelo lado pessoal quanto pelo profissional. Obrigada pelo companheirismo e pelo curioso dom de mesmo em meio à seriedade tornar as experiências leves, de ser grande e humilde. Obrigada por ter unido seus conhecimentos matemáticos e de física aos da biologia.

Ao **prof. Raul Manhães de Castro** pela orientação, a quem sou imensamente grata pelos ensinamentos, pela oportunidade, pelo voto de confiança e pelo maior incentivo que recebi dentro da universidade. Obrigada prof. Raul!

Ao **prof. Omar**, pela co-orientação e grande contribuição com seus conhecimentos e experiência.

Às professoras **Ana Elisa Toscano**, **Kelli Ferraz**, **Raquel Aragão** e **Lígia Galindo**, por terem compartilhado seus conhecimentos comigo, cada uma em sua área.

Às colegas de laboratório, **Carol Cadete**, **Thaynam Oliveira**, **Jacqueline Silva** e **Érika Cadena** pela companhia na rotina do laboratório e pelas trocas de experiências e aprendizado. E a **Daniele Tenório** pela sua participação nos experimentos. Obrigada meninas!

Aos demais companheiros do laboratório, **Diego Lacerda**, **Paula Briele**, **Bárbara Santana**, **Diego Visco**, **Manuela da Luz**, **Henrique Cavalcanti** e **André Terácio**.

Ao **Sr. Edeones França**, pelo cuidado com os animais.

À **Solange Martins**, **Fátima Barros** e **Gilberto**, pela disponibilidade e solicitude, pela competência de resolver nossas burocracias.

Ao apoio financeiro da FACEPE.

E diante de todos estes motivos, agradeço às energias Universais, às consciências, às forças geradoras do Universo, à **Deus**! Obrigada pela caminhada!

RESUMO

Há algumas décadas a ciência vem dando particular atenção às relações do homem atual com o alimento e seu estilo de vida, emergindo, nas últimas décadas, alta incidência de patologias, tais como obesidade e síndrome metabólica. Elas, associam-se diretamente ao balanço energético positivo crônico. Entretanto, o controle do balanço energético não se constitui num sistema fechado e recebe influencia de outros sistemas fisiológicos. Assim, disfunções em sistemas, como o eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal (HPA) e o de relógios circadianos, podem repercutir sobre o balanço energético, contribuindo para a etiologia da obesidade. Neste sentido, destaca-se a participação de dois receptores nucleares, os de glicocorticoides e o REV-ERB α , pertencentes ao eixo HPA e sistema circadiano, respectivamente. Diante do exposto, o atual trabalho teve como objetivo, analisar os efeitos da utilização de agonistas dos receptores de glicocorticoides e do REV-ERB α , sobre o balanço energético. Para isto, foram utilizados ratos wistar albinos, aos 60 dias de idade. Em uma primeira etapa do estudo, foi administrado o agonista para os receptores de glicocorticoides (dexametasona) por duas vias de administração; intraperitoneal e intracerebroventricular. Observou-se que quando administrado por via intraperitoneal (5 mg/kg) a dexametasona promoveu aumento do consumo alimentar, sem alterações no ponto de saciedade, além de redução do gasto energético. Quando administrado por via intracerebroventricular (10 μ g/rat), o grupo tratado com o agonista apresentou aumento do consumo alimentar associado ao retardo no ponto de saciedade e redução do gasto energético. Juntos, esses resultados demonstram que os glicocorticoides contribuem para o balanço energético positivo. Em uma segunda etapa do estudo, foi utilizado o agonista para os receptores REV-ERB α . Quando administrados por via intracerebroventricular (10 μ g/rat) resultou em aumento no consumo alimentar, ganho de massa corporal, da eficiência alimentar e bem como redução da tolerância à glicose. Entretanto, em animais sob alimentação *ad libitum*, a ativação central desses receptores promoveu aumento da atividade locomotora e consequentemente do gasto energético, sem alterações no consumo alimentar e eficiência energética. Esses resultados evidenciam que a função dos receptores REV-ERB α sobre o balanço energético pode ser influenciada pelo status energético da célula. De uma maneira geral, conclui-se que os receptores nucleares influenciam, cada um a sua maneira, o controle do balanço energético, podendo contribuir, quando em desequilíbrio, para a etiologia da obesidade e dos distúrbios metabólicos. Os receptores de glicocorticoides promovem balanço energético positivo, enquanto os receptores REV-ERB α influencia o balanço energético a depender do tecido ou estado energético do organismo.

PALAVRAS-CHAVE: Ritmo Circadiano. Glicocorticoides. Consumo Alimentar. Metabolismo Energético.

ABSTRACT

Science has been paying particular attention to man's relationships with food and his lifestyle, given the high incidence of pathologies such as obesity and metabolic syndrome in the last decades. They are associated directly with the chronic positive energy balance. However, energy balance control does not constitute a closed system and is influenced by other physiological systems. Thus, dysfunctions in systems such as the Hypothalamic Pituitary Adrenal axis (HPA) and circadian clocks can affect the energy balance, contributing to the etiology of obesity. In this sense, we highlight the participation of two nuclear receptors, glucocorticoids and REV-ERB α , belonging to the HPA axis and circadian system, respectively. In view of the above, the present work aimed to analyze the effects of the use of glucocorticoid receptor agonists and REV-ERB α on the energy balance. For this, albino wistar rats were used at 60 days of age. In a first part of the study, the glucocorticoid receptor agonist (dexamethasone) was administered by two routes of administration; Intraperitoneal and intracerebroventricular. It was observed that when administered intraperitoneally (5 mg / kg) dexamethasone promoted an increase in food intake, without changes in the satiety point, in addition to a reduction in energy expenditure. When administered intravenously (10 μ g / rat), the group treated with the agonist presented an increase in dietary intake associated with delay at the satiety point and reduction of energy expenditure. Together, these results demonstrate that glucocorticoids contribute to a positive energy balance. In a second stage of the study, the agonist for the REV-ERB α receptors was used. When administered intracerebroventricularly (10 μ g / rat) resulted in increased food intake, body mass gain, food efficiency and reduced glucose tolerance. However, in animals fed ad libitum, central activation of these receptors promoted increased locomotor activity and consequently energy expenditure, without alterations in food intake and energy efficiency. These results show that the role of REV-ERB α receptors on the energy balance can be influenced by the energetic status of the cell. In general, it is concluded that the nuclear receptors influence, in their own way, the control of energy balance, and may contribute, when unbalanced, to the etiology of obesity and metabolic disorders. Glucocorticoid receptors promote positive energy balance, whereas REV-ERB α receptors influence the energy balance depending on the tissue or energetic state of the organism.

KEYWORDS: Circadian Rhythm. Glucocorticoids. Food Consumption. Energy Metabolism.

Lista de tabelas

Tabela 1	Relação de macronutrientas da ração padrão de biotério.....	57
Tabela 2	Composição do líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF).....	61

Tabelas do Artigo 1

Table 1	Relation of macronutrients of the standard chow animal feed.....	90
Table 2	Effects of i.p. and i.c.v. injection of dexamethasone on the evaluated parameters during Behavioral Sequence of Society (BSS).....	91
Table 3	Effects of i.p. and i.c.v. injection of dexamethasone on the length of stay in the area of open field during locomotor activity.....	92

Tabelas do Artigo 2

Table 1	Effect of i.c.v injection of REV-ERB α agonist on the length stay in the área of open field during locomotor activity.....	115
---------	---	-----

Lista de Ilustrações

Figura 1	Controle do balanço energético.....	22
Figura 2	Ação dos receptores de glicocorticoides.....	28
Figura 3	Funcionamento molecular dos ritmos circadianos.....	35
Figura 4	Integração entre glicocortióides e ritmos circadianos.....	36
Figura 5	Ação dos receptores REV-ERB α	39
Figura 6	Cirurgia de Estereotaxia.....	58
Figura 7	Esquema do desenho experimental da administração dos agonistas.....	59
Figura 8	Esquema do método de atividade locomotora.....	64
Figura 9	Esquema do teste de Eficiência Alimentar.....	66
Figura 10	Esquema do método do registro contínuo da atividade locomotora.....	68

Lista de Ilustrações do Artigo 1

Figure 1	Effects of Dex administration on FI in rats aged 60 days.....	86
Figure 2	Effects of Dex administration on satiety in rats aged 60 days after 4 hours fasting.....	87
Figure 3	Parameters of locomotor activity in rats aged 60 days treated with i.p. injection of Dex.....	88
Figure 4	Parameters of locomotor activity in rats aged 60 days treated with i.c.v. injection of Dex.....	89
Figure S1	Body mass.....	93

Lista de Ilustrações do Artigo 2

Figure 1	Effects of i.c.v. of the REV-ERB α agonist on FI, BW, FE and rectal temperature.....	112
Figure 2	Effects of i.p. of the REV-ERB α agonist on FI, BW, FE and glucose tolerance.....	113
Figure 3	Effects of i.c.v. of the REV-ERB α agonist on glucose and insulin tolerance.....	114
Figure 4	Effects of i.c.v. of the REV-ERB α agonist on parameters of locomotor activity and continuous recording of activity.	116
Figure 5	Effects of i.c.v. of the REV-ERB α agonist on FI, BW, FE in animals fed <i>ad libitum</i>	117
Figure S1	Food efficiency test design.....	118

Sumário

1	APRESENTAÇÃO.....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	Obesidade, epidemiologia e impactos sócio-econômicos.....	15
2.2	Etiologia da obesidade e síndrome metabólica.....	17
2.2.1	Relações ambientais e fisiológicas.....	17
2.2.2	Controle do balanço energético.....	19
2.3	Síndrome de Cushing, Estresse, Mudança de turnos no trabalho e Síndrome do comer noturno.....	22
2.4	Glicocorticóides e Eixo HPA.....	26
2.4.1	Envolvimento dos glicocorticoides com o balanço energético.....	28
2.5	Ritmos circadianos.....	33
2.5.1	Envolvimento dos ritmos circadianos e receptores Rev-erba com o metabolismo e balanço energético.....	38
2.6	Referências.....	43
3	HIPÓTESES.....	56
4	OBJETIVOS.....	56
4.1	Objetivos específicos.....	56
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
5.1	Animais.....	57
5.2	Procedimento Cirúrgico – Estereotaxia.....	57
5.3	Administração da droga.....	59
5.3.1	Administração do agonista dos receptores nucleares de glicocorticoides – Dexametasona.....	60
5.3.2	Administração do agonista dos receptores nucleares REV-ERB α (GSK 4112).....	60
5.4	Testes comportamentais.....	61
5.4.1	Consumo alimentar.....	61
5.4.2	Sequencia Comportamental de Saciedade (SCS).....	62
5.4.3	Atividade Locomotora (Campo aberto).....	63
5.4.3.1	<i>Procedimentos.....</i>	<i>63</i>
5.4.3.2	<i>Sistema de captação de imagem.....</i>	<i>63</i>
5.5	Eficiência alimentar.....	65
5.6	Temperatura Corporal.....	66
5.7	Teste de tolerância à glicose e Teste de tolerância à insulina.....	67
5.8	Registro contínuo da atividade locomotora.....	67
6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	69
7	RESULTADOS.....	70
7.1	Artigo 1.....	70
7.1.2	Abstract.....	72
7.1.3	Introcuction.....	73
7.1.4	Materials and Methods.....	74
7.1.4.1	<i>Animals.....</i>	<i>74</i>

7.1.4.2	<i>Intracerebroventricular (i.c.v.) surgery</i>	74
7.1.4.3	<i>Drung administration</i>	74
7.1.4.4	<i>Behavioral assessment</i>	75
7.1.4.5	<i>Relative food intake</i>	75
7.1.4.6	<i>Behavioral Society Sequence</i>	75
7.1.4.7	<i>Locomotor activity</i>	75
7.1.5	<i>Data analysis</i>	76
7.1.6	<i>Results</i>	76
7.1.6.1	<i>Relative food intake</i>	76
7.1.6.2	<i>Parameters of feeding intake</i>	77
7.1.6.3	<i>Parameters of locomotor activity</i>	77
7.1.7	<i>Discussion</i>	78
7.1.8	<i>References</i>	82
7.2	Artigo 2	94
7.2.1	<i>Abstract</i>	96
7.2.2	<i>Introduction</i>	97
7.2.3	<i>Materials and Methods</i>	98
7.2.3.4	<i>Animals</i>	98
7.2.3.5	<i>Cannula Placement and REV-ERBa administration</i>	98
7.2.3.6	<i>Food Efficiency</i>	99
7.2.3.7	<i>Rectal Temperature</i>	99
7.2.3.8	<i>Glucose Tolerance Test (GTT) and Insulin Tolerance Test (ITT)</i>	99
7.2.3.9	<i>Open Field</i>	100
7.2.3.10	<i>Continuos Recording of animal activity</i>	100
7.2.4	<i>Data Analysis</i>	100
7.2.5	<i>Results</i>	101
7.2.5.1	<i>FE after 24-hour fasting</i>	101
7.2.5.2	<i>Retal Temperature</i>	101
7.2.5.3	<i>Glucose Tolerance Test (GTT) and Insulin Tolerance Test (ITT)</i>	101
7.2.5.4	<i>Open Field and Continuos recording of locomotor activity</i>	102
7.2.5.5	<i>FE ad libitum</i>	102
7.2.6	<i>Discussion</i>	102
7.2.7	<i>Reference</i>	107
8	DISCUSSÃO	119
9	CONCLUSÃO	131
	REFERENCIAS	133
	APENDICES	139
	APENDICE A- Artigo submetido à revista Neurobiologia	139
	APENDICE B- Artigo publicado na revista Neurobiologia	161
	ANEXO I	181
	ANEXO II	182

1 APRESENTAÇÃO:

Constitui-se na atualidade, um problema de grande magnitude a incidência da obesidade e seus impactos sócio-econômicos. Estimativas realizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), apontam que no ano de 2030, cerca de 57,8% da população adulta mundial poderá apresentar sobrepeso ou obesidade [1]. A obesidade, por si só, pode ser caracterizada como acúmulo de tecido adiposo localizado ou generalizado, provocado por desequilíbrio nutricional associado ou não a distúrbios genéticos ou endócrino metabólicos [2]. No entanto, esse acúmulo de adiposidades não constitui a única característica da obesidade, surgindo em decorrência dela, uma série de patologias de ordem variada, que correspondem às suas comorbidades [3]. Dentre essas, destacam-se às de ordem metabólica caracterizada por um quadro de resistência à insulina e dislipidemias, associados ao aumento dos níveis circulantes de fatores pró-inflamatórios [3]. Estas comorbidades, predisõem o seu portador ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo II e doenças cardiovasculares, manifestações que em conjunto, caracterizam o que se conceitua como Síndrome Metabólica [3].

Sendo os impactos sócio-econômicos proporcionais à gravidade das consequências da obesidade e/ou síndrome metabólica, torna-se coerente o interesse de implementar medidas profiláticas, que junto às curativas, permitam perspectivas mais otimistas. Nesse sentido, aflora a necessidade do conhecimento mais detalhado quanto aos fatores de origem desta síndrome. Entretanto, a etiologia da obesidade envolve mecanismos fisiopatológicos complexos e multifatoriais, exigindo uma abordagem detalhada e focada apesar de multidisciplinar. Às causas da obesidade, tem sido atribuída a fatores ambientais que englobam as experiências nutricionais vivenciadas desde o período crítico do desenvolvimento até as da vida adulta [4,5,6]. Isto reflete a problemática das relações do homem com o ambiente que o circunda dentro de seu contexto evolutivo. Além disso, atribui-se ainda a essa fisiopatogenia, fatores endógenos em associação aos ambientais. Nestes, estão inclusas as disfunções em um ou mais componentes humorais pertencentes ao Controle do Balanço Energético. Amplas são as evidências demonstrando que polimorfismos e níveis de expressão de seus genes, alterações em suas secreções, ou até mesmo diferencial densidade de seus receptores, podem induzir ao fenótipo de sobrepeso e obesidade [7,8,9]. No entanto, o controle do balanço energético não se

constitui num sistema fechado. Ele recebe influencia de outros sistemas fisiológicos capacitando o organismo a se manter em homeostase. Assim, disfunções em outros sistemas podem repercutir sobre o balanço energético, apresentando uma função adicional na etiologia da obesidade. Neste sentido, apontamos a participação de alguns receptores nucleares, dentre os quais destacamos os receptores de glicocorticoides, pertencente ao eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal HPA [10], bem como os receptores REV-ERB α , pertencente ao sistema de ritmos circadianos [11].

Observações clínicas, demonstram que a hipersecreção de glicocorticoides promove desequilíbrio do balanço energético e aumento no consumo alimentar culminando em obesidade [10]. As observações experimentais, porém, apesar de inúmeras, carecem de resultados que permitam uma conclusão sólida, havendo muitos resultados contraditórios. Estudos há que demonstram que ratos adrenalectomizados, e, portanto, incapazes de secretar glicocorticoides, apresentam anorexia que é revertida com a administração de glicocorticoides [12]. Enquanto outros demonstram que o tratamento crônico com injeções intraperitoneal de agonistas para receptores de glicocorticoides, resultam em redução do consumo alimentar e do peso corporal [13]. Sendo esta a realidade das informações acerca do envolvimento dos receptores nucleares de glicocorticoides com o balanço energético, faz-se necessário o planejamento e execução de mais pesquisas que tenham como objetivo esclarecer os efeitos deste sistema humoral sobre o comportamento alimentar.

No tocante às relações da etiologia da obesidade com os ritmos circadianos, algumas evidências apontam para um caminho promissor na busca desta compreensão. O gene *clock*, que diretamente está ligado ao sistema de ritmos circadianos, também contribui para o balanço energético resultando em obesidade quando presente com mutação [14]. Pertencente ainda a este sistema de relógios circadianos, destaca-se o receptor nuclear REV-ERB α , considerado por muitos autores o principal responsável pela integração metabolismo e ritmos circadianos [15]. Recentemente, alguns estudos epidemiológicos apontaram relação direta entre polimorfismos do gene *Rev-erba* e fenótipo de obesidade em adolescentes e adultos [16]. Relação essa também encontrada na população espanhola [11], norte americana e mediterrânea [17]. Frente a essas descobertas recentes, cabe-nos a investigação do possível envolvimento deste receptor com o balanço energético. Este envolvimento constitui uma nova e promissora linha de pesquisa sobre a etiologia da obesidade, havendo também a possibilidade da descoberta de novos instrumentos farmacológicos para o seu tratamento.

Diante das possíveis relações entre obesidade e disfunções em dois diferentes receptores nucleares, a proposta do atual estudo é analisar os efeitos da ativação dos receptores de glicocorticoides, bem como dos receptores REV-ERB α sobre o consumo e gasto energético. Nós propomos que: 1- A ativação periférica e central dos receptores nucleares de glicocorticoides contribue para o balanço energético positivo, resultante do aumento do consumo alimentar e/ou diminuição do gasto energético; 2- A ativação dos receptores nucleares REV-ERB α centrais contribue para o balanço energético negativo, resultante da diminuição do consumo alimentar e/ou aumento do gasto energético.

O atual estudo resultou na confecção de um artigo original, intitulado, “**Peripheral and central glucocorticoid signaling contributes to positive energy balance in rats**” submetido e aceito pela revista *Hormone and Metabolic Research*. Neste artigo, nós avaliamos os efeitos da ativação dos receptores de glicocorticoides periféricos e centrais sobre o consumo e gasto energético. O segundo artigo original, intitulado “**The central activation of the nuclear receptors REV-ERB α affects the energetic balance in a manner dependent on the energetic state of the organism**”, será submetido à revista *International Journal of Obesity*. Neste artigo, nós avaliamos os efeitos da ativação dos receptores nucleares REV-ERB α centrais sobre o consumo e gasto energético.

1- REVISÃO DA LITERATURA:

O envolvimento de receptores nucleares de glicocorticoides e REV-ERB α na etiologia da obesidade e suas comorbidades no estresse e disfunções nos relógios circadianos

2.1. Obesidade, epidemiologia e impactos sócio-econômicos:

Sobrepeso e obesidade podem ser definidos, na conceituação da Organização Mundial de Saúde (OMS), como o acúmulo de tecido adiposo localizado ou generalizado, provocado por desequilíbrio nutricional associado ou não a distúrbios genéticos ou endócrino metabólicos [1]. Esse acúmulo adiposo exerce consequências na vida do indivíduo, predispondo a doenças, que em conjunto denomina-se de obesidade e suas comorbidades [2]. Essas comorbidades, podem se dividir em duas categorias; uma associada às consequências físicas advindas da massa corporal excessiva, como osteoartrite, principalmente nos joelhos e coluna vertebral, apneia do sono, refluxo gastroesofágico, dentre outros. E a segunda categoria refere-se às desordens metabólicas, como o aumento dos níveis de triacilgliceróis (TG), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), conhecida como colesterol ruim, redução dos níveis das lipoproteínas de alta densidade (HDL), conhecida como colesterol bom, aumento da glicemia, e aumento da liberação de fatores pró-inflamatórios pelo próprio tecido adiposo, como as citocinas, que incluem a proteína C reativa (PCR), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) [3,4]. Atribui-se a essas comorbidades metabólicas a gênese do que se conceitua atualmente como Síndrome Metabólica, que pode ser definida como um grupo de fatores de risco inter-relacionados, de origem metabólica, que diretamente contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial e distúrbios da coagulação (aumento da adesão plaquetária e do inibidor do ativador do plasminogênio-PAI-1) e/ou diabetes do tipo 2 [5]. Então, além de um indivíduo portador da Síndrome Metabólica apresentar as características bioquímicas supracitadas, em decorrência delas, ele também irá apresentar doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008 cerca de 1,5 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso, onde destes mais de 500 milhões eram obesos [1]. Se comparados com dados obtidos em 1980, o aumento na prevalência de obesidade foi mais de

duas vezes e as projeções para os próximos anos indicam que em 2030 um número próximo a 3,3bilhões de adultos, ou 57,8% da população adulta mundial, terá sobrepeso ou obesidade [6]. Frente a tais estimativas, a obesidade é apontada como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Em um recente estudo realizado no Brasil, Pesquisa de Orçamento Familiar (POF), foi demonstrado a incidência de sobrepeso e obesidade em homens e mulheres nas idades entre 5 a 9 anos, 9 a 19 anos e 20 anos ou mais, entre os anos 2008 e 2009. Os resultados são alarmantes, a prevalência de sobrepeso em homens com idade de 20 anos ou mais é de 50,1% e cerca de 12,4% de obesidade. Em mulheres, com a mesma idade, a incidência de sobrepeso e obesidade é de 41,4% e 13,2% respectivamente. Ainda mais preocupante são os dados de crianças entre 5 e 9 anos, onde foram registrados índices de sobrepeso de 34,8% em meninos e 32,0% em meninas, e obesidade de 16,6% em meninos e 11,8% em meninas. Entretanto, o que mais chama atenção aos resultados desta pesquisa, é a comparação desses índices entre os anos de 2008 – 2009 com os de 1989. Verifica-se um aumento maior que o dobro dos casos de sobrepeso e obesidade de 1989 para 2009, evidenciando e, instigando a futuros estudos, o fato de que o contexto atual no qual o homem está inserido possa estar envolvido na etiologia da obesidade e síndrome metabólica [7]. No Recife, segundo o VIGITEL 2008 [8], que consiste no acompanhamento por linhas telefônicas dos índices estatísticos de sobrepeso e obesidade nas capitais brasileiras, estima que entre os homens adultos há uma incidência de 51,5% de sobrepeso e em mulheres, essa incidência é de 41,6%. Essas estimativas mostram que os índices de sobrepeso em nosso estado podem ser mais elevados que a média nacional, como mostrado pelo estudo do POF 2009 [7].

Visto a gravidade da obesidade e síndrome metabólica, bem como a elevação de sua incidência, estima-se que os custos do tratamento e as consequências médico-sociais possam gerar problemas de elevada ordem. Nos estados Unidos, por exemplo, o custo discriminado para a obesidade no ano de 1990, foi estimado em 46-68 bilhões de dólares. Este valor aumentou para 99 bilhões de dólares em 1995 e tem excedido esse valor anualmente [9] chegando a 147 bilhões de dólares em 2010 [10]. Embora à obesidade seja atribuída uma ampla gama de patologias, como doenças degenerativas nas articulações, câncer de mama, útero, próstata e coluna, a maior parte dos gastos estão diretamente associados às patologias cardiovasculares relacionadas a síndrome metabólica [11]. No Brasil estima-se que o SUS gaste anualmente cerca de 3,6 bilhões de reais com o tratamento destas doenças, sendo 2,4 bilhões (68%) com o tratamento hospitalar e 1,2 bilhões (32%) com ambulatorial. As doenças cardiovasculares, provavelmente por apresentarem-se com maior frequência, foram responsáveis por 67% desses

custos [12]. De modo a modificar essas estimativas preocupantes, torna-se necessário o implante de ações preventivas, que incluiriam modificações no estilo de vida da população. No entanto, tendo a obesidade uma etiologia multifatorial e complexa, faz-se necessário a elaboração de mais estudos que objetivem a compreensão dos processos fisiopatológicos subjacentes a obesidade, de modo a auxiliar a formação de estratégias na adoção destas medidas preventivas e/ou curativas.

2.2-Etiologia da obesidade e síndrome metabólica

2.2.1- Relações ambientais e fisiológicas:

A etiologia da obesidade é um assunto complexo envolvendo tanto fatores ambientais, como a má nutrição e sedentarismo, quanto fisiológicos e genéticos. Os fatores ambientais parecem ser predominantes, mas interrelacionados com os fatores genéticos e/ou fisiológicos. Ou seja, a genética determina a suscetibilidade a doenças, enquanto que os fatores ambientais determinam qual indivíduo, geneticamente suscetível, desenvolverá a patologia [13].

A história evolutiva do homem, está intimamente relacionada às influências dos comportamentos de procura, seleção e consumo de alimentos. A própria postura bípede, sugere-se, pode ter sido estabelecida como uma postura para alimentação, uma vez que possibilitava o acesso a alimentos antes não alcançados. As dimensões encefálicas também se correlacionam com a alimentação. O cérebro do homem moderno responde por 10 a 12% da demanda de energia de um corpo em repouso [13]. Um *Australopithecus* típico, com um cérebro de 450cm³, teria reservado cerca de 11% de sua energia em repouso para este órgão; enquanto um *Homo erectus*, com um cérebro de cerca de 850 cm³, teria reservado cerca de 16% de sua energia em repouso. Contudo, a expansão do cérebro não poderia ter ocorrido se os hominídeos não tivessem adotado uma alimentação rica em calorias. É provável que para o antigo *Homo* expandir a sua massa cerebral fosse necessária uma dieta variada, não somente composta por frutos, tubérculos e raízes, mas alimentos de origem animal, como forma de aumentar a densidade calórica [13]. Com o decorrer do tempo, o homem que era essencialmente nômade, caçador coletor, passa a manipular de modo mais intenso a terra e surge o desenvolvimento da agricultura e da criação de animais, as colheitas tornaram-se mais abundantes e favoreceram o aumento da população. Surge então, o que se chama de Revolução Agrícola. Nos últimos

10.000 anos, desde a Revolução Agrícola, o genoma humano basicamente não mudou, ou seja, a taxa de mutação espontânea para o DNA nuclear está estimada em 0,5% por milhão de anos [14]. Portanto, os 10.000 anos passados ainda não foram suficientes para causar mudanças importantes em nossos genes, que são muito similares aos dos nossos ancestrais que viveram no Período Paleolítico, há 40.000 anos, no tempo em que nosso perfil genético foi estabelecido [14]. Mais tarde, a Revolução Industrial difundiu-se pelo mundo, e o trabalho realizado pelo homem começa a ser substituído pelo de máquinas. Apresentando impactos não apenas na estrutura social e econômica, mas também no estilo de vida e saúde das pessoas. Com o advento da globalização gerada pela cultura de massa, o padrão alimentar tem sofrido influências que favorecem hábitos alimentares inadequados, priorizando a praticidade nos *fast foods*. Como o homem não está geneticamente adaptado para alta ingestão calórica e baixo gasto energético (sedentarismo), a tendência é que essa energia se acumule no organismo sob forma de gordura, resultando no aumento acelerado da incidência e prevalência de sobrepeso e obesidade, além de doenças crônicas relacionadas a ela [15].

Atualmente, a nossa dieta difere muito daquela para a qual nossos genes foram selecionados. Ela mudou essencialmente no que diz respeito ao tipo, à quantidade de ácidos graxos essenciais e à constituição antioxidante dos alimentos [14]. Estudos epidemiológicos apontam que entre os anos de 1990 e 2010 houve um aumento de 2% no rendimento per capita mundial que é diretamente proporcional ao aumento do consumo energético. Observa-se que, em média, o consumo mundial de energia da dieta aumentou em cerca de 210 kcal por pessoa/dia, ou seja, 8% [16]. Nota-se que o aumento foi maior nos países em desenvolvimento quando comparado aos países desenvolvidos. Entre todas as regiões dos países em desenvolvimento, os maiores aumentos absolutos se concentraram na Ásia (onde o crescimento econômico foi mais rápido), na América Latina e no Caribe, enquanto os menores aumentos ocorreram na Oceania e na África Subariana (onde o crescimento econômico foi lento) [16]. O aumento da energia disponível dos alimentos tem sido acompanhado por mudanças na composição das dietas. Observa-se que a presença dos carboidratos derivados de cereais, raízes e tubérculos é muito menor nas dietas de famílias com maior renda. Em contrapartida, a relativa presença dos carboidratos a partir de açúcares e outros alimentos é maior em famílias de renda mais alta, assim como a contribuição de gorduras [16].

Entretanto, fatores ambientais como a má nutrição, também pode alterar permanentemente a fisiologia e até a genética do indivíduo. Sabe-se que a má-nutrição caracterizada por desbalanço nos nutrientes em uma dieta, é um fator predisponente ao

desenvolvimento de obesidade e comorbidades. Mas, quando esta má nutrição ocorre durante a gestação, lactação e/ou primeira infância, podem gerar modificações na genética e fisiologia predispondo o indivíduo ao desenvolvimento de obesidade na vida adulta [17]. Diversos estudos vêm apontando que um genótipo pode dar origem a uma variada gama de fenótipos dependendo das influências ambientais. Sendo a gestação e lactação os períodos associados à ontogênese onde ocorrem intensos processos de diferenciação e maturação de células e tecidos, sugere-se este período como o de maior vulnerabilidade às influências ambientais [17] e, portanto, definindo como período crítico do desenvolvimento [18]. Acredita-se que o ambiente exercendo influência, especialmente as nutricionais, sobre este período crítico, pode alterar permanentemente a morfologia e fisiologia dos tecidos e órgãos [17]. Muitas dessas alterações não objetivam apenas as respostas homeostáticas do feto ao ambiente, mas sim introduzir expectativa de futuras mudanças adaptativas que podem conferir ao organismo sobrevivência e sucesso reprodutivo, sendo por isso denominadas de “respostas preditivas adaptativas” [19]. No entanto esta predição pode limitar as respostas adaptativas do organismo a um ambiente diferente daquele em que foi gerado. E é exatamente esta incompatibilidade entre o ambiente intra-uterino e pós-natal que predispõe o organismo às doenças metabólicas na vida adulta [19]. Um bom exemplo é que em ratas gestante a restrição de macronutrientes como proteínas e lipídeos levam a alterações no metabolismo provocando mudanças na utilização e armazenamento desses componentes na prole predispondo-a a intolerância à glicose, dislipidemias e hipertensão [20].

Além de fatores ambientais e influência deste sobre a fisiologia e genética, alguns indivíduos apresentam alterações no sistema de balanço energético que o predispõe ao aumento do consumo alimentar e redução do gasto energético, apresentando como fenótipo resultante, obesidade e síndrome metabólica.

2.2.2-Controle do Balanço energético:

A fome, o apetite e a saciedade são sensações ditadas pelo sistema de controle do comportamento alimentar que tem como objetivo a manutenção do balanço energético no organismo. O balanço energético consiste em um estado metabólico, precisamente regulado dia após dia, caracterizado pelo equilíbrio entre gasto e consumo energético. Essa regulação precisa, na qual chamamos de controle do comportamento alimentar, integra informações

vindas de tecidos e órgãos periféricos acerca do estoque nutricional do corpo, com o hipotálamo, localizado no diencéfalo. Neste último, as informações periféricas influenciarão o balanço entre peptídeos orexigênicos e anorexigênicos que refletirá no consumo alimentar e gasto energético. No hipotálamo o núcleo arqueado apresenta um importante papel na regulação do balanço energético. Localizado subjacente a eminência média, região desprovida da proteção da barreira hematoencefálica, o núcleo arqueado é altamente acessível aos sinais periféricos do balanço energético. Neste núcleo há duas populações de neurônios primários [21], uma cujo circuito neural expressa o *peptídeo pro-opiomelanocortina* (POMC) e o *transcrito relacionado à cocaína e anfetamina* (CART), que inibem o consumo alimentar [22, 23] e a outra cujo circuito neural expressa *neuropeptídeo Y* (NPY) e *neuropeptídeo agouti* (AgRP) que estimulam o consumo alimentar [24]. Do núcleo arqueado axônios de neurônios POMC/CART e NPY/AgRP projetam-se para outros núcleos hipotalâmicos tais como o núcleo paraventricular, hipotálamo dorsomedial, área hipotalâmica lateral e perifornical, que possuem neurônios de segunda ordem e integram informações sobre energia de homeostase [22, 25] (Figura 1).

Quanto aos sinais periféricos destacam-se a leptina e insulina, cuja secreção é proporcional ao estoque adiposo, e quando presentes no sistema nervoso central interagem com receptores hipotalâmicos diminuindo o consumo alimentar [26]. Sinais provenientes do trato gastrointestinal também integram o controle da ingestão alimentar. A grelina é um hormônio secretado pelas células oxínticas do estômago, bem como duodeno, íleum, cecum e colon [27] que resulta no aumento do consumo alimentar e peso corporal e reduz a utilização de reservas lipídicas [28]. O peptídeo YY (PYY) secretado no trato gastrointestinal distal [29] e o polipeptídeo pancreático (PP) presente em células pancreáticas exócrinas e no colon [30] aumentam pos-prandialmente e seus níveis podem ser influenciados pelo conteúdo nutricional da refeição [31]. A colecistocinina (CCK) é secretada no duodeno e no jejuno [30] e sua ação diminui o consumo alimentar e a duração da refeição [32] em resposta também à distensão gástrica [32].

Há centenas de estudos, mostrando que qualquer alteração na expressão de genes ou mal funcionamento de alguns desses sinais anorexígenos e orexígenos tanto periférico como em nível central ou até dos seus receptores, pode predispor o indivíduo ao desenvolvimento da obesidade. Um exemplo clássico, é o que acontece com a deficiência da leptina. Camundongos com mutação no gene que codifica a leptina, com genótipo ob/ob, apesar de crescerem normalmente, possuem níveis de corticosterona elevado, são incapazes de manter-se aquecidos e mostram comportamento e fisiologia de animais com apetites insaciáveis. Como

consequência, eles tornam-se severamente obesos, pesando até três vezes mais que os camundongos com genótipo padrão [33]. Esses animais apresentam distúrbios metabólicos muito similares aos de animais diabéticos e são insulinoresistentes. Quando a leptina é injetada em camundongos com genótipo ob/ob, eles perdem peso e aumentam sua capacidade locomotora e de produção de calor [34]. Alterações nos sistemas de outros sinais periféricos também contribuem para um fenótipo de obesidade. Camundongos machos que apresentam diminuição na densidade de receptores de insulina no Sistema Nervoso Central, apresentam hiperfagia, desenvolvendo obesidade e dislipidemia com aumento dos níveis periféricos da insulina [35]. A severa hiperfagia observada nos indivíduos portadores da síndrome de Prader Willi, cujo característica mais marcante é a obesidade, é resultante da hipersecreção da grelina [36]. Ainda, alguns pacientes obesos apresentam hipossensibilidade ao PP [37], além de hipossecreção basal e pós-prandial [38]. O mesmo é observado com relação a secreção do PYY [39].

Similarmente, as alterações nos níveis e sinalização dos peptídeos centrais, também estão envolvidos na etiologia da obesidade. Polimorfismos no gene que codifica o POMC ou anormalidades no seu processamento resultam em obesidade e insuficiência adrenal em humanos [40]. Assim como ratos que apresentam aumento da expressão do AgRP são hiperfágicos e obesos [41]. No entanto, a etiologia da obesidade pode ser ainda mais complexa envolvendo um maior número de genes e funções fisiológicas. Para citar mais um exemplo, em 2005 foi publicado um artigo evidenciando que camundongos deficientes em um gene denominado Clock, apresentam obesidade, resultante da diminuição no gasto energético, bem como alterações na expressão dos genes codificadores do CART e Grelina [42]. O gene Clock faz parte de um grupo de genes chamados genes relógios, responsáveis pela manutenção dos nossos ritmos biológicos. Sugere-se que a obesidade e distúrbios alimentares decorrente deste tipo de alteração genética, pode estar relacionada principalmente à síndrome do comer noturno. Mas, os estudos nesta área ainda são recentes abrindo uma nova linha de pesquisa para o entendimento da etiologia da obesidade e desordens metabólicas.

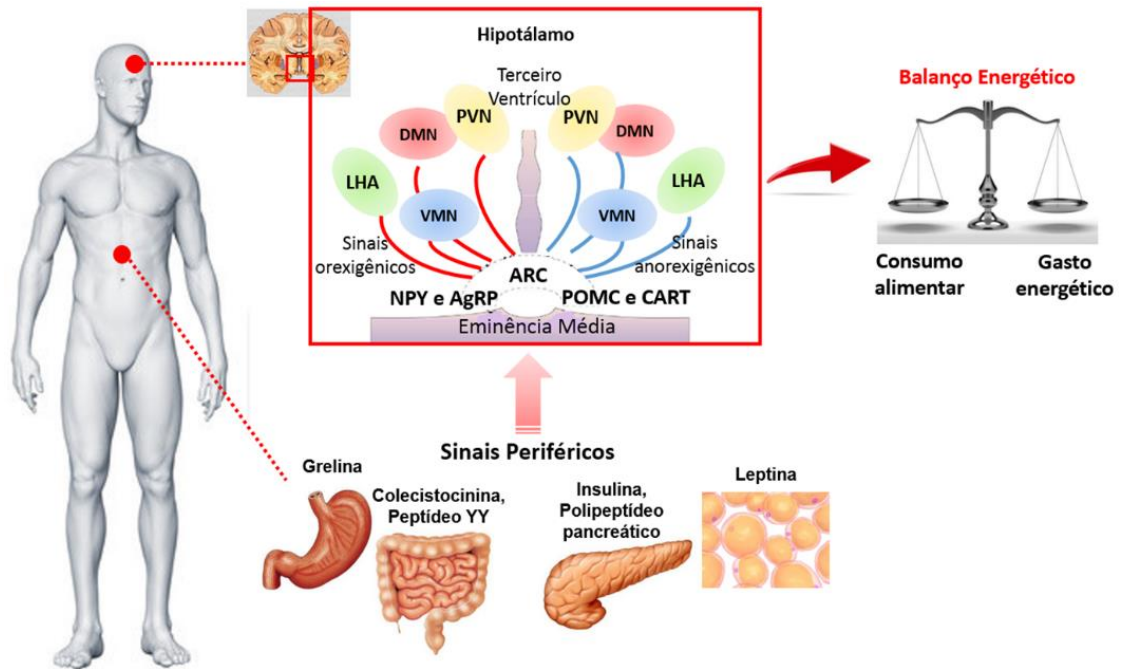


Figura 1: Controle do balanço energético. Sinais periféricos que ditam o estado nutricional do organismo são integrados em regiões encefálicas, dentre as quais, destaca-se o hipotálamo. Esses sinais promovem um balanço entre peptídeos orexigênicos e anorexigênicos no ARC. Este, emite projeções para os demais núcleos hipotalâmicos (DMN, VMN, PVN...), influenciando o balanço de outros peptídeos. Este balanço será refletido no consumo e gasto energético. Figura baseada em informações de Elias e colaboradores [22] e Kalra e colaboradores [25].

2.3-Síndrome de Cushing, Estresse, Mudança de turnos no trabalho e Síndrome do comer noturno:

Visto uma fisiopatogenia de tamanha complexidade, não é de se surpreender que a obesidade esteja relacionada ao mal funcionamento de alguns sistemas que possam estar influenciando de maneira indireta, o sistema de controle do balanço energético. E nesse aspecto, diversas linhas de pesquisas recentes tem se detido a esses sistemas, com o objetivo de melhor compreender os processos subjacentes a etiologia da obesidade.

Um bom exemplo de um desses sistemas em estado não fisiológico que pode contribuir com a etiologia da obesidade, é o que acontece com a síndrome de Cushing. Pacientes portadores desta síndrome, apresentam hipersecreção de glicocorticoides, que podem ser causadas por adenomas hipofisários secretores de ACTH, correspondendo a causa mais comum da Síndrome endógena, responsável por cerca de 70% dos casos [43], seguida das patologias

adrenais, como tumores ou, mais raramente, hiperplasia adrenal bilateral [44], e a síndrome do ACTH ectópico, que corresponde a tumores que sintetizam atipicamente ACTH [45]. É exatamente a essa hipersecreção de glicocorticoides, que é atribuída o aparecimento dos sintomas mais proeminentes da síndrome, que incluem hipertensão, resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia, com aumento do LDL e redução do HDL, esteatose hepática, obesidade, principalmente central, bem como aumento do catabolismo muscular esquelético e tecido conjuntivo, culminando com atrofia e fraqueza muscular [46]. Tais sintomas também estão presentes em pacientes que fazem uso prolongado de anti-inflamatórios e terapia imunossupressora com glicocorticoides [47].

Sendo a hipersecreção de glicocorticoides resultante de causas endógenas indutora de obesidade e distúrbios metabólicos, pode-se inferir que essa hipersecreção tendo como gatilho fatores ambientais, também poderia contribuir com a fisiopatogenia de tal quadro. De fato, é o que tem sido relatado no tocante ao estresse prolongado. A resposta ao estresse é um fenômeno adaptativo que permite o organismo desviar recursos para lidar com um perigo real ou antecipá-lo, e em seguida restaurar a energia dispendida, capacitando-o a preparar-se para outra reação ao estresse posterior [48]. No entanto, quando o agente estressor é excessivo ou crônico, a resposta pode ser não adaptativa, contribuindo para a etiologia de uma variedade de doenças [48], algumas delas, podendo estar envolvidas com alterações no balanço energético. Etologicamente, uma resposta de supressão do apetite frente a um evento estressor pode ser útil para desviar o indivíduo de comportamentos que o tirariam da defensiva, como os de forrageio e alimentação, tornando-o mais aptos a defender-se de predadores, por exemplo. Assim sendo, é comum haver diminuição do apetite durante um estresse agudo [49]. No entanto, diante de eventos estressores prolongados, a energia dispensada na reação de luta ou fuga, precisa ser restaurada, e o impacto sobre o balanço energético, deve ter como resultado, o aumento do consumo alimentar e redução do gasto energético. Perifericamente, os elevados níveis de glicocorticoides contribuem com a atividade da lipoproteína lipase, aumentando os estoques de gordura, particularmente o visceral [50]. Em termos de controle do balanço energético, os glicocorticoides promovem aumento do consumo alimentar, agindo diretamente sobre os peptídeos hipotalâmicos [51], bem como sobre os níveis de hormônios periféricos podendo induzir resistência a leptina [52] e a insulina [53]. Além disso, aos elevados níveis de glicocorticoides, também são atribuídos a preferência pelo consumo de alimentos palatáveis, como já foi evidenciado por Foster e colaboradores que ratos, quando submetidos a estresse crônico, apresentam preferência ao consumo de alimentos densamente calóricos [54]. O

aumento do consumo desses alimentos, está envolvido com um complexo mecanismo de retroalimentação negativa, onde o valor de recompensa do alimento suprime o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Não surpreendentemente, o consumo de alimentos palatáveis tem uma função de amenizar os sintomas do estresse [54]. Possivelmente, a preferência ao consumo de alimentos calóricos, faça parte de um mecanismo estratégico que possibilite uma maior alocação de glicose para o encéfalo, já que este, sob condições de estresse crônico, demanda uma cota extra de energia [55].

Não apenas o estresse crônico, mas as pressões sociais e estilo de trabalho, também apresentam forte impacto sobre a fisiologia dos indivíduos, contribuindo para a etiologia da obesidade e disfunções metabólicas. A mudança de turnos de trabalho é um esquema bastante frequente em vários setores de produção, hospitais, dentre outros, que pode ser definida como um horário de trabalho fora do horário de um trabalho diurno habitual [56]. Em decorrência da rotatividade de mudanças de turnos de trabalho, a ritmicidade circadiana nas funções biológicas do indivíduo, pode dessincronizar-se com os ritmos circadianos ambientais. Esse desajuste temporal interno, pode contribuir para o desenvolvimento de doenças, como distúrbios do sono, metabólicos e obesidade [57]. A mudança de turnos de trabalho, pode resultar em aumento do índice de massa corporal (IMC), bem como da razão circunferência abdominal/quadril, em ambos os sexos, independentemente da idade, tabagismo, prática de atividades físicas e grau de escolaridade [58]. Di Lorenzo e colaboradores, evidenciaram que a incidência de sobrepeso e obesidade em trabalhadores de turno é de 62,4% e 15,7%, respectivamente, e esses índices independem da idade e do tempo de exposição a esse regime de trabalho. No entanto, o que mais chama atenção a esses resultados, é que eles foram colhidos em uma região Mediterrânea [59]. Sabe-se que a indução da termogênese em resposta ao alimento, é diferente a depender do horário em que a refeição é realizada, sendo a termogênese maior quando a refeição é realizada pela manhã, em comparação com a tarde e à noite [60]. Este fato pode estar relacionado com o ganho de peso observado em trabalhadores de turno, que apresentam uma dessincronização nos períodos de alimentação. Em associação ao padrão alimentar, a privação de sono torna-se um contribuinte para o desajuste metabólico, culminando com intolerância à glicose, resistência à insulina e dislipidemias [61]. Além dessas desordens metabólicas, trabalhadores de turno também apresentam maiores incidências de hipertensão, diabetes e doenças arteriais coronárias [62,63]. Os impactos de um trabalho de turnos podem ser tão fortes que se estima que um indivíduo sob este esquema de trabalho apresente o mesmo risco de desenvolvimento de doenças coronárias que um indivíduo fumante de um maço de cigarro por dia [64].

Além das alterações nos ciclos circadianos de ocorrência ambiental seja um fator predisponente ao desenvolvimento de obesidade, alterações endógenas nos ritmos circadianos de alguns sistemas fisiológicos, podem aumentar a probabilidade de um indivíduo vir a desenvolver sobrepeso e obesidade. Este fato, pode ser evidenciado na observação da Síndrome do Comer Noturno. Pacientes portadores da síndrome do comer noturno, relatada pela primeira vez em 1955, apresentam um atraso de fase no padrão circadiano do consumo alimentar, manifestada por hiperfagia a noite, com despertares noturnos acompanhados por ingesta de alimentos e anorexia matinal [65]. Um paciente portador desta síndrome, chega a consumir, pelo menos, 25% do total de suas calorias ingeridas em 24 horas, depois do jantar [65]. No entanto, as relações entre a síndrome do comer noturno com a obesidade são complexas. Estima-se que cerca de 52% dos indivíduos portadores da síndrome, apresentavam peso compatível com a altura antes dos sintomas aparecerem e desenvolveram obesidade [66]. Além disso, verifica-se uma incidência de 3,8% a 12,4% de portadores da síndrome que apresentam diabetes mellitus tipo 2 [67]. Contudo, até o presente momento, pouco se sabe quais mecanismos levariam ao desenvolvimento de tal síndrome, bem como da obesidade. O que tem sido proposto, é que esses indivíduos apresentam um atraso de fase, de 1h a 2,8h, nos ciclos circadianos da leptina, insulina e melatonina, bem como avanço de fase da grelina e redução de amplitude nos ciclos circadianos da grelina, insulina e cortisol [68].

Embora as causas das disfunções fisiológicas supracitadas sejam de origem diversa, suas consequências caminham para um ponto em comum, desenvolvimento de obesidade e comorbidades. Outro ponto em comum proposto entre elas, inclui as vias que as permitem influenciar de maneira indireta o controle do balanço energético. Dentre essas vias provavelmente encontram-se receptores nucleares, especialmente os localizados no centro do controle do balanço energético, o hipotálamo. Destacam-se aqui, exemplos que evidenciam a influência da hipersecreção de glicocorticoides, bem como as alterações no sistema de ritmos circadianos, sobre o balanço energético. Propõe-se, que no primeiro, haja envolvimento dos receptores nucleares de glicocorticoides, que atuariam aumentando consumo e diminuindo gasto energético, enquanto, no segundo, receptores nucleares Rev-erba, atuariam de modo oposto, reduzindo consumo e aumentando gasto energético. Assim sendo, pode-se associar como parte da etiologia da obesidade, distúrbios que envolveriam aumento da atividade dos receptores nucleares de glicocorticoides e/ou diminuição da atividade de receptores Rev-erba. Atribui-se estes eventos a disfunções no eixo Hipotálamo- Pituitária- Adrenal (HPA) e no sistema de geração dos ritmos circadianos. No entanto, os estudos publicados até o momento

referentes a temática, são contraditórios, no tocante aos receptores de glicocorticoides e escassos, no tocante aos receptores Rer-erba. Faz-se necessário, então, o empreendimento de mais trabalhos que permitam a melhor compreensão do papel destes receptores, no controle do balanço energético e no processo fisiopatológico da obesidade.

2.4-Glicocorticoides e Eixo HPA:

O eixo Hipotálamo- Pituitária- Adrenal (HPA) é um sistema de regulação de liberação hormonal que regula os níveis circulantes sistêmicos de glicocorticoides e que corresponde ao maior sistema neuroendócrino em mamíferos que prover a resposta imediata de defesa contra o estresse [48]. Os glicocorticoides, cortisol em humanos e corticosterona em ratos, além de atuarem nas respostas de fuga ou luta, também estão envolvidos no metabolismo, especialmente os da glicose, gorduras e proteína [69], no sistema imune, agindo como anti-inflamatórios e imunossuppressores, bem como no humor e funções cognitivas [70,48].

Sob condições basais, os níveis circulantes de glicocorticoides apresenta um padrão circadiano e ultradiano. No entanto, a atividade do eixo HPA é consideravelmente aumentada quando o organismo é exposto a algum evento estressor. Esta resposta tem início com a ativação de várias vias neurais aferentes, principalmente as que tem origem no sistema límbico e no tronco encefálico que por sua vez, promove a liberação de hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) e arginina vasoativa (AVP) pelos neurônios parvocelulares do Núcleo Paraventricular do hipotálamo (PVN) [71]. Estes neuropeptídios, sendo liberados na eminência média, caem na circulação através da via posta, permitindo suas chegadas à pituitária anterior, onde irão agir sobre os receptores CRHR1, para o CRH, e V1bR, para a arginina vasopressina [72,73]. Uma vez agindo sobre esses receptores, o CRH e AVP, promovem aumento na transcrição do gene POMC, bem como sua metabolização em hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) [74] que ao cair na circulação sistêmica, terá como tecido-alvo as glândulas adrenais, onde irá comandar a síntese e liberação de hormônios glicocorticoides [75]. Os glicocorticoides são sintetizados na zona fasciculada do córtex adrenal, a partir do momento em que o ACTH se liga ao receptor de melanocortina tipo 2 (MC2R) [76]. Subsequente a ativação deste receptor, seguem-se os eventos; ativação do adenilato ciclase, com liberação de AMP cíclico e consequente ativação da Proteína Kinase A (PKA). A ativação da PKA influencia a síntese de glicocorticoides por duas vias, uma genômica e outra não genômica. A primeira, inclui a ativação de fatores

transcricionais que levam ao aumento da transcrição do gene da StAR (steroidogenic acute regulatory protein), enquanto a segunda, promove mudanças pós-translacionais na StAR, que inclui sua fosforilação em sítios específicos, com consequente ativação desta proteína [77]. A função da StAR é a de mobilizar e permitir a entrada de moléculas de colesterol para o interior das mitocôndrias, sendo este o passo taxa-limitante da síntese de glicocorticoides. Uma vez dentro das mitocôndrias, as moléculas de colesterol passarão por uma série de etapas sob ação de uma cascata enzimática que resultará no produto final, glicocorticoides [78].

Os glicocorticoides atuam em diversos tecidos alvo que expressam seus receptores, e estes, podem ser de dois tipos, os receptores de glicocorticoides (GR) e os receptores de mineralocorticoides (MR), ambos, pertencentes a superfamília dos receptores nucleares [79]. Os GRs e MRs diferem quanto a afinidade com as moléculas de glicocorticoides e localização. Os MRs, apresentam uma afinidade consideravelmente maior a se ligarem com o hormônio quando comparado com os GRs. No entanto, essa afinidade apenas é mais elevada, sob condições basais, onde os níveis de glicocorticoides circulantes são baixos [80]. Quando a concentração de glicocorticoides estão elevadas além do nível basal, os GRs apresentam uma maior afinidade pelo hormônio que os MRs [81]. No tocante às suas distribuições, os GRs estão amplamente distribuídos pelo corpo, incluindo tanto tecidos e órgãos periféricos como os centrais, enquanto que os MRs são mais expressos no rim e coração. No entanto, nos locais de regulação do eixo HPA, ambos receptores são expressos em densidades similares [80].

Quando inativos, esses receptores residem no citoplasma da célula ligados e estabilizados por moléculas de proteínas chaperonas [82]. Após ligação com glicocorticoides, o complexo chaperona-receptor se dissocia, capacitando o complexo receptor-ligante (molécula de glicocorticoide) ser translocado para o núcleo da célula, onde atuarão como fatores transcricionais [83]. Os GR, por exemplo, na presença do ligante, formam homodímeros no citoplasma e, ao serem translocados para o núcleo, se ligam a uma região de sequência de bases nitrogenadas específicas, região promotora, chamada de região GREs, que correspondem a um elemento presente no gene, responsivo a glicocorticoides, tendo como alvo, a transcrição desses genes [84] (Figura 2). O primeiro ponto crítico para a ativação dos GRs é a biodisponibilidade intracelular de glicocorticoides, que é determinada por um processo chamado de controle ligante pre-receptor. Neste mecanismo, há a ação da enzima 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase (11- β -HSD), e suas duas isoformas, I e II [85]. Enquanto a isoenzima 11- β -HSD II catalisa a conversão de cortisol em seu metabólito inativo, cortisona, a isoenzima 11- β -HSD I reduz a cortisona na sua forma bio-ativa, cortisol, promovendo uma restauração local dos seus níveis

[86], particularmente em locais responsivos a glicocorticoides tal como fígado, tecido adiposo, pulmão e sistema nervoso central [87]. Assim sendo, os níveis relativos dessas duas isoenzimas são importantes para determinar as concentrações intracelulares de glicocorticoides [88].

Os glicocorticoides também têm como função a de regular o eixo HPA, e, portanto, sua própria liberação. Isso se dá através de um mecanismo de retroalimentação negativa, onde os seus níveis circulantes são capazes de inibir a liberação do ACTH pela glândula hipófise, e do CRH e AVP pelo núcleo paraventricular no hipotálamo [89]. Além disso, os glicocorticoides também são capazes de regular o eixo HPA de forma indireta, através da modulação de outras estruturas encefálicas, como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, todos esses exercendo regulação sobre o PVN [90].

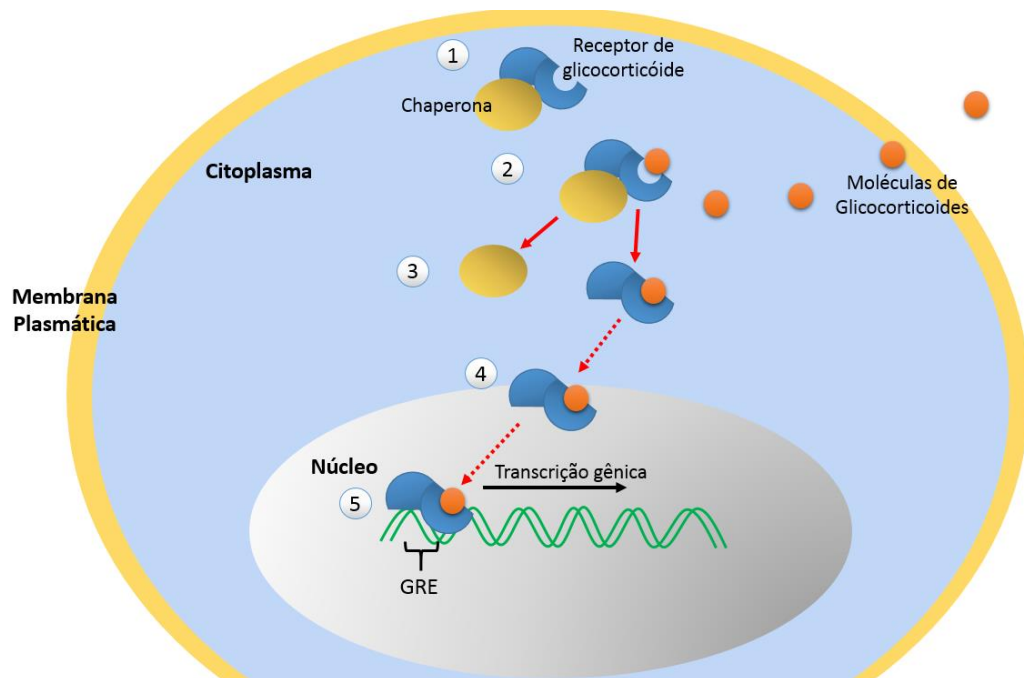


Figura 2: Ação dos receptores de glicocorticoides. (1) Inativos, esses receptores se localizam no citoplasma ligados a proteínas chaperonas, (2) na presença de glicocorticoides, ligam-se a ele, (3) dissociando-se das proteínas chaperonas tornando-se ativos. (4) o conjunto receptor - ligante é translocado para o núcleo. (5) Neste, reconhece e se liga ao elemento GRE comandando a expressão de genes-alvo. Figura baseada em informações de Schoneveld e colaboradores [84].

2.4.1-Envolvimento dos glicocorticoides com o balanço energético:

Ao eixo HPA, vem sendo atribuída funções relacionadas às respostas ao estresse, cognitivas e memória, além de imunossupressoras. Na literatura, vários registros apontam para

um possível envolvimento deste eixo com o balanço energético, influenciando tanto o consumo quanto o gasto energético.

Em humanos, são fortes as evidências deste envolvimento diante do quadro desenvolvido pela hipersecreção de glicocorticoides na síndrome de Cushing. Em contrapartida, a hipossecreção de glicocorticoides, característica da síndrome de Addison, resulta em redução do consumo alimentar e perda de peso corporal [91]. No estresse, as evidências não são tão conclusivas, havendo respostas diferentes a depender do tipo de agente estressor. Quando o estresse está relacionado ao local de trabalho, é observado aumento no consumo alimentar nos indivíduos sob tal condição [92]. Nos casos em que o agente estressor pode ser qualificado como de exame ou avaliação e cirúrgico, os resultados são mistos [93,94]. Em mulheres, foi verificado aumento no consumo alimentar associado a elevação dos níveis plasmáticos de cortisol em resposta a um evento estressor [95]. Entretanto, os estudos em animais experimentais são mais abundantes e dispõe-se de mais evidências. Ratos que passaram por adrenalectomia apresentam anorexia que pôde ser revertida com a suplementação com glicocorticoides [96]. Além do aumento do consumo alimentar, a suplementação também promoveu preferência ao consumo de alimentos palatáveis, quando oferecido dieta padrão de biotério em associação com uma dieta hiperpalatável [97]. Quando agonistas dos receptores de glicocorticoides são administrados pela via intracerebroventricular em ratos, é observado aumento do consumo alimentar e ganho de peso corporal [98,99]. No entanto, contrapondo-se a esses achados, há estudos demonstrando que o tratamento crônico com injeções intraperitoneal desses agonistas reduz o consumo alimentar e o peso corporal [100, 101]. E como exemplo prático, em humanos, é observado que indivíduos que apresentam depressão desencadeada por estresse crônica, apresentam sintomas como redução do consumo alimentar [102].

Sob perspectiva do controle do balanço energético em nível central, vários componentes do eixo HPA podem exercer influência sobre os peptídeos hipotalâmicos sendo refletido no balanço energético. Um desses componentes é o CRH, expresso no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que compõe um dos núcleos ligados ao controle do balanço energético [103]. Seus receptores, além de serem expressos neste núcleo, também são expressos no núcleo ventromedial (VMH), que também está ligado ao controle do balanço energético [103]. A administração intracerebroventricular de CRH reduz o consumo alimentar em ratos [104], e esse efeito anorético é atribuído a inibição da via orexígena do NPY. Já foi demonstrado uma inibição desta via em resposta a administração de agonistas dos receptores do CRH diretamente

no PVN [105]. Quanto ao ACTH, também se dispõe de evidências que mostra sua função sobre o PVN influenciando o comportamento alimentar. Quando administrado pela via intracerebroventricular em ratos, o ACTH promove redução do consumo alimentar [106]. Adicionalmente, a injeção de anticorpos para o ACTH diretamente no PVN, promove aumento do consumo alimentar [107]. Em conjunto estes resultados mostram que a ação do CRH e do ACTH em núcleos hipotalâmicos, como o PVN e VMH, são responsáveis pela supressão do consumo alimentar observado durante o estresse agudo. É possível que o efeito orexígeno dos glicocorticoides estejam relacionados à inibição da secreção do CRH e ACTH [104].

O componente final do eixo HPA, os glicocorticoides, liberados na circulação sistêmica pelas adrenais, são capazes de chegar até a eminência média, agirem sobre os receptores nucleares de glicocorticoides hipotalâmicos e influenciarem o balanço energético. De fato, alguns estudos apontam para o efeito orexígeno dos glicocorticoides com influência sobre a expressão dos peptídeos hipotalâmicos. A administração central de agonistas dos receptores de glicocorticoides estimula a liberação de NPY no hipotálamo mediobasal em ratas, assim como em cultura de neurônios hipotalâmicos [108]. Interessantemente, a influência dos glicocorticoides sobre a expressão de NPY é oposta à do CRH, enquanto o primeiro promove aumento, o segundo promove diminuição da expressão. Sugere-se então, um mecanismo entre esses dois hormônios, onde no estresse agudo, a ação inibitória do CRH sobre a via do NPY reduz o consumo alimentar, enquanto o estresse crônico, a ação ativadora dos glicocorticoides sobre a via do NPY, aumenta o consumo [105]. Ao que indica o estudo de Lee e colaboradores, a expressão do AgRP no hipotálamo também é influenciada pelos glicocorticoides. A administração central de antagonistas desses receptores inibe a expressão do AgRP no núcleo arqueado (ARC) em resposta ao fastio [109]. Ademais, esse estudo também demonstrou que o gene codificador do AgRP apresenta o elemento GRE em sua região promotora. Isto leva a compreender que a ativação dos receptores de glicocorticoides são suficientes para promover um aumento na expressão desse gene [109]. Diferente do que acontece com o NPY, que por não possuir o GRE na região promotora, necessita da atuação de outros fatores transcricionais em resposta a ativação dos receptores de glicocorticoides [109]. Em animais sob fastio, os glicocorticoides foram apontados como de fundamental importância para promover o balanço de peptídeos hipotalâmicos de modo a resultar no balanço energético positivo (aumento do consumo alimentar e diminuição do gasto energético) [110]. No entanto, o tema ainda é controverso, visto que alguns estudos não estão em consonância com as evidências do envolvimento dos glicocorticoides com o balanço energético positivo. É o caso do estudo

publicado por Savontaus e colaboradores, que não evidenciaram a necessidade da presença de glicocorticoides circulantes no balanço de peptídeos hipotalâmicos em ratos sob fastio [111]. Além disso, também foi observado que ratos submetidos a injeções intraperitoneal de agonistas dos receptores de glicocorticoides apresentaram redução do consumo alimentar associado a diminuição na expressão do NPY e AgRP no hipotálamo [100]. Assim sendo, as relações entre os glicocorticoides com o controle do comportamento alimentar e possíveis mecanismos envolvidos ainda são inconclusivas.

Assim como suas relações com o controle do balanço energético em nível central, os glicocorticoides também podem influenciar este sistema em nível periférico. Tem sido demonstrado que a ativação do eixo HPA em ratos aumenta a liberação de leptina pelo tecido adiposo [112]. Em contrapartida, os glicocorticoides parecem diminuir a resposta a leptina. É o que foi demonstrado em ratos adrenalectomizados que apresentam maior resposta aos efeitos anoréticos da leptina, sendo esta resposta minimizada pela reposição de glicocorticoides [52]. No hipotálamo, é encontrado uma grande densidade de receptores para leptina nos neurônios que fazem parte da via da melanocortina. A resposta anorética a agonistas dos receptores da melanocortina foi exacerbada em ratos adrenalectomizados, enquanto que a reposição com glicocorticoides promoveu uma redução nesta resposta [113]. Estes dados sugerem que glicocorticoides promovem resistência a leptina, induzindo a uma diminuição na resposta da via da melanocortina. A indução da resistência a leptina pode explicar por que em humanos a administração crônica de glicocorticoides pode levar a aumento do consumo alimentar, apesar dos elevados níveis de leptina [114]. A ação e secreção da insulina também pode ser influenciada pelos níveis circulantes de glicocorticoides. Em humanos, a administração de agonistas dos receptores de glicocorticoides diminui a sensibilidade a insulina [115], que pode ser evidenciado pelo aumento dos seus níveis plasmáticos [116]. E mesmo com o aumento dos níveis de insulina, os elevados níveis de glicocorticoides, resultam em aumento do consumo alimentar [117]. A grelina, também é outro sinal periférico que parece ser influenciado pelos níveis circulantes de glicocorticoides. Ratos submetidos a vários tipos de estresse, como social e de contenção, por exemplo, apresentaram aumento nos níveis plasmáticos da grelina, que estão diretamente associadas ao aumento do consumo alimentar [118].

Com relação ao gasto energético, vale salientar o estudo de Smith e colaboradores, que demonstraram que a infusão de CRH em humanos resulta em aumento de cerca de 14% no gasto energético em repouso [119]. Com relação aos glicocorticoides, os estudos também são controversos. Quando hidrocortisona, um agonista dos receptores de glicocorticoides, é

infundido durante 16 e 60 horas em humanos, foi observado um aumento no gasto energético [120]. Entretanto, outros estudos apontam que agonistas desses receptores não exercem qualquer efeito sobre o gasto energético no repouso [121,122], ou mesmo, que teriam a capacidade de reduzir esse gasto [123]. Ainda, é conveniente ressaltar que os níveis plasmáticos de glicocorticoides promove aumento na expressão dos receptores NPY Y2 no tecido adiposo abdominal. Neste tecido, o receptor NPY Y2, ao ser ativado, estimula angiogênese, proliferação e diferenciação de novos adipócitos, sugerindo que por esta via, a ativação do eixo HPA, promove aumento do estoque de gordura abdominal [124].

Apesar das evidências por vezes contraditórias, estando o eixo HPA envolvido com o controle do balanço energético, não é de se surpreender que algum tipo de disfunção neste eixo, pode levar a desequilíbrio no balanço energético, predispondo o indivíduo ao desenvolvimento de sobrepeso e obesidade. Vários polimorfismos nos genes codificadores dos diferentes componentes do eixo HPA estão descritos na literatura, estando boa parte deles, associados ao fenótipo de obesidade. Um polimorfismo no gene T255G, que codifica o CRH, está associado com aumento da secreção de glicocorticoides diurna, porém, nenhuma relação entre este polimorfismo e obesidade foi documentado [125]. Em contrapartida, um polimorfismo raro no exon 2 do gene codificador do POMC, um precursor do ACTH, resulta em insuficiência de ACTH, que culmina num fenótipo de obesidade precoce [126]. Em nível de metabolização de glicocorticoides, o polimorfismo do primeiro intron do gene codificador da enzima 11b-HSD II, está associado com o aumento local dos níveis de glicocorticoides, principalmente em nível de tecido adiposo subcutâneo, que parece resultar em obesidade [127]. Similarmente, três distintos polimorfismos encontrados no gene codificador dos receptores de glicocorticoides tem sido associado a obesidade visceral e aumento da razão circunferência abdominal/quadril, estando todos eles induzindo uma hipersensibilidade à glicocorticoides [128,129].

Diante das evidências aqui expostas, sugere-se um forte envolvimento do eixo HPA, bem como disfunções em alguns de seus componentes, com o balanço energético e obesidade, respectivamente. No entanto, esses registros na literatura, apesar de numerosos, ainda são insuficientes para se chegar a uma conclusão definitiva. Torna-se viável assim, a formulação de mais estudos, que possam documentar o envolvimento da cascata de componentes pertencentes ao eixo HPA com o controle do balanço energético, e em caso de disfunções, com o desenvolvimento de obesidade e desordens metabólicas.

2.5-Ritmos circadianos:

A constante rotação da Terra envolta de seu próprio eixo e do sol gera mudanças cíclicas com período de 24 horas de luz e escuro. Desde o surgimento da vida, esses períodos cíclicos funcionam como forma de seleção, contribuindo para o desenvolvimento de mecanismos celulares que mantêm os relógios circadianos dos organismos. Esses relógios circadianos permitem a antecipação de eventos diários como a disponibilidade de alimento, probabilidade de encontrar predadores, intensidade luminosa (para plantas), produzindo ciclos comportamentais, fisiológicos e bioquímicos sincronizados com os eventos ambientais diários, que aperfeiçoam a sobrevivência. Esta sincronização é gerada pelos relógios circadianos endógenos na dependência do tempo geofísico e persiste por um período de aproximadamente 24 horas mesmo na ausência de sinais externos [130]. Não surpreendentemente, a luz é o principal “*zeitgebers*” (sincronizador) dos ritmos biológicos desde organismos unicelulares, como cianobactérias, até os animais mais derivados, como os mamíferos, estando este sistema circadiano amplamente distribuído na árvore filogenética. Diversos estudos têm revelado que diferentes genes coordenam as oscilações moleculares, estes elementos genéticos, denominados genes relógios, constituem o mecanismo gerador da ritmicidade e parecem estar organizados em uma autorregulação por *feedback* em diversos tecidos e órgãos na maioria dos organismos já estudados [131].

Nos mamíferos, há oscilações diárias em várias funções, como circulação de hormônios, na função cardíaca e circulatória e no centro de controle da temperatura corporal. Nesses animais, sugere-se que o sistema circadiano, com relação aos osciladores, está organizado hierarquicamente [132]. O Núcleo Supraquiasmático (NSQ), localizado no hipotálamo e dorsal ao quiasma óptico, está no topo desta hierarquia e exerce influência sobre a ritmicidade de outros tecidos, que constituem os relógios periféricos [133]. Entre todos os sinais capazes de sincronizar exatamente em 24 horas o NSQ, o ciclo claro/escuro, denominado sinal fótico, é o mais relevante. Através do trato retino-hipotalâmico (TRH) há associação entre o NSQ e o ciclo claro/escuro percebido pelos fotopigmentos da retina [134], coordenando os ritmos através de vias neurais e hormonais que resultam na sincronização dos osciladores periféricos [132], sendo por isso chamado de light-entrainable oscillator- LEO [130].

O padrão circadiano observado nas atividades do NSQ e dos osciladores periféricos são resultantes também de um padrão circadiano na expressão do conjunto de genes, chamados de

“genes relógios” residentes nestes tecidos. Dentre esses destacam-se o Clock, o Brian-muscle-Arnt-like (Bmal1), o Period1 (Per1), Period2 (Per2), Period3 (Per3), Cryptochrome1 (Cry1) e Cryptochrome2 (Cry2). Muito dos produtos desses genes funcionam como fatores transcricionais, que possuem os domínios PAS (Per-Arnt-Sim) e basic helixloop-helix (bHLH), envolvidos respectivamente nas interações proteína-proteína e proteína-DNA [135]. As proteínas codificadas pelos genes Clock e Bmal1, CLOCK e BMAL1 formam heterodímeros CLOCK:BMAL1 que são capazes de se ligar e ativar a transcrição de genes que possuem o elemento E-box (CACGTG) em suas regiões promotora, que corresponde a uma região com uma sequência específica de bases nitrogenadas, que servem de reconhecimento para os fatores transcricionais [136] (Figura 3). Esses elementos E-box estão presentes nas regiões promotoras dos genes Per, Cry e dois genes receptores nucleares Rer-erba (reverse erythroblastosis virus α) e Rora (retinoic acid receptor-related orphan receptor α). Desse modo, o CLOCK:BMAL1 ativa a transcrição dos genes Period (Per1-3) e Cryptochrome (Cry1-2) [137,131] e dos genes dos receptores nucleares Rer-erba e Rora, estes últimos acumulam-se durante o dia [138] que será visto mais adiante. As proteínas PER e CRY acumulam-se no citoplasma e formam homo e heterodímeros via seus domínios PAS. A entrada deste heterodímero no núcleo inibe a transcrição de seus próprios genes, Per e Cry, através de mecanismos envolvidos diretamente com a desacetilação de histonas e outras modificações na cromatina [136]. A expressão do gene Clock se dá constitutivamente no NSQ, já a expressão do gene Bmal1 apresenta variações no decorrer do período circadiano [139]. Sendo assim, a expressão rítmica do complexo ativador transcricional CLOCK:BMAL1 é controlada via oscilações circadianas na transcrição do gene Bmal1 [140]. Este é controlado pelos produtos dos genes dos receptores orphan nuclear Rer-erba e Rora. A proteína REV-ERBa é translocada para dentro do núcleo e se liga ao elemento ROR da região promotora do gene Bmal1 inibindo a sua transcrição. Desaparecendo a REV-ERBa durante a noite há a liberação da inibição da região promotora, o elemento ROR desta é agora ocupado pela proteína ROR α que estimula a transcrição do gene Bmal1 reiniciando assim o próximo ciclo circadiano da expressão de genes [141,142]. Todos esses genes mencionados apresentam um ritmo de 24 horas nas células, caracterizando assim, os ritmos circadianos [135].

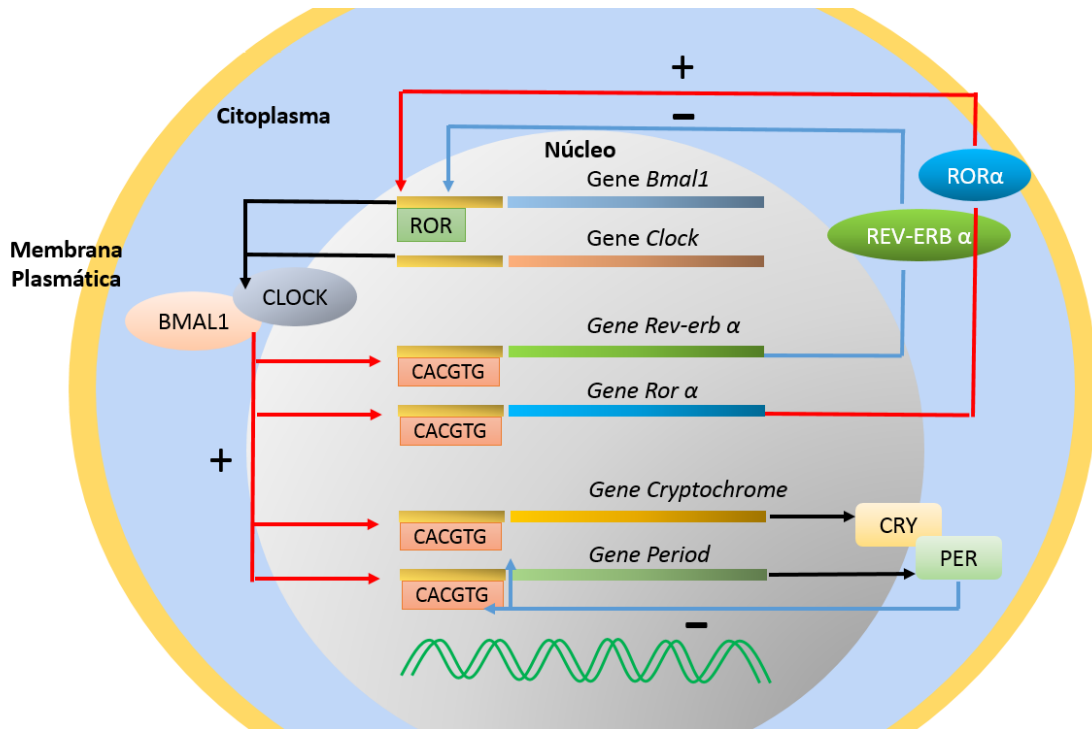


Figura 3: Funcionamento molecular dos ritmos circadianos. As proteínas CLOCK e BMAL1 formam heterodímeros, CLOCK:BMAL1 que se ligam a elementos E-box ativando a transcrição dos genes relógios Cry, Per, e dos receptores nucleares Rev-erb e Ror. Enquanto as proteínas CRY e PER, ao formarem heterodímeros CRY:PER reprimem a transcrição dos genes portadores do E-box, incluindo seus próprios genes, as proteínas REV-ERB e ROR agem sobre a expressão do Bmal1. Durante o ciclo claro, REV-ERB reprime a transcrição, enquanto ROR, no ciclo escuro a ativa. A resultante é a oscilação diferencial da expressão desses fatores transcricional que, por sua vez, irão influenciar a oscilação na transcrição de outros genes. Figura baseada em informações de Hasting e colaboradores [137], e Panda e colaboradore [138].

As oscilações circadianas na expressão dos genes relógios coordenam a expressão de outro grupo de genes envolvidos com várias outras funções celulares num período de aproximadamente 24 horas, sendo estes denominados de clock-controlled genes (CCGs), que são genes controlados pelos relógios [143]. Este fenômeno pode acontecer por pelo menos dois mecanismos; interação direta com o elemento E-box da região promotora desses genes, e através da regulação de outros CCGs que são, por sua vez, fatores transcricionais, como por exemplo, o DBP [144] que controla a expressão circadiana de várias enzimas digestivas no fígado requeridas para o metabolismo [132]. Estima-se assim, que cerca de 10% dos genes de mamíferos sofram influencia do sistema de ritmicidade circadiana e apresentem uma variação ao longo do dia em suas expressões [132]. Assim sendo, muitos sistemas biológicos refletem esse padrão de ritmicidade circadiana, e não surpreendentemente, dentre esses sistemas,

destacam-se os de interesse abordados aqui, como os ritmos do eixo HPA, bem como no comportamento alimentar e controle do balanço energético.

Os níveis plasmáticos de glicocorticóides variam naturalmente ao longo do dia apresentando seu pico um pouco antes e início da manhã, e nadir no final do ciclo claro para os animais diurnos, incluindo o homem [145]. O sistema de ritmos circadianos influencia diretamente o eixo HPA por intermédio de conexões existentes entre o NSQ com os neurônios CRH/AVP presentes no PVN [146]. Além disso, a inervação simpática que ligam o NSQ à glândula adrenal, quando ativada, promove maior responsividade desta última ao ACTH, ditando a liberação rítmica de glicocorticóides [147]. Os glicocorticóides, por sua vez, apresentam uma forte influencia sobre as oscilações periféricas constituindo um importante exemplo de interação entre o NSQ e relógios periféricos mediado por hormônios [148]. Esta influencia foi demonstrada através da injeção em ratos do agonista dos receptores de glicocorticóide, a dexametasona, que resultou na mudança de fase da ritmicidade circadiana em tecidos periféricos como o fígado [149]. Esse potencial sincronizador apresentado pelos glicocorticóides pode ser explicado pela existência de elementos responsivos aos glicocorticóides nas regiões promotoras de alguns genes relógios envolvidos na maquinaria molecular da ritmicidade circadiana, como é o caso dos genes *Per1* e *2* que apresentam em suas regiões promotoras o elemento GRE, podendo culminar na ativação transcricional dos mesmos [150, 151] (Figura 4).

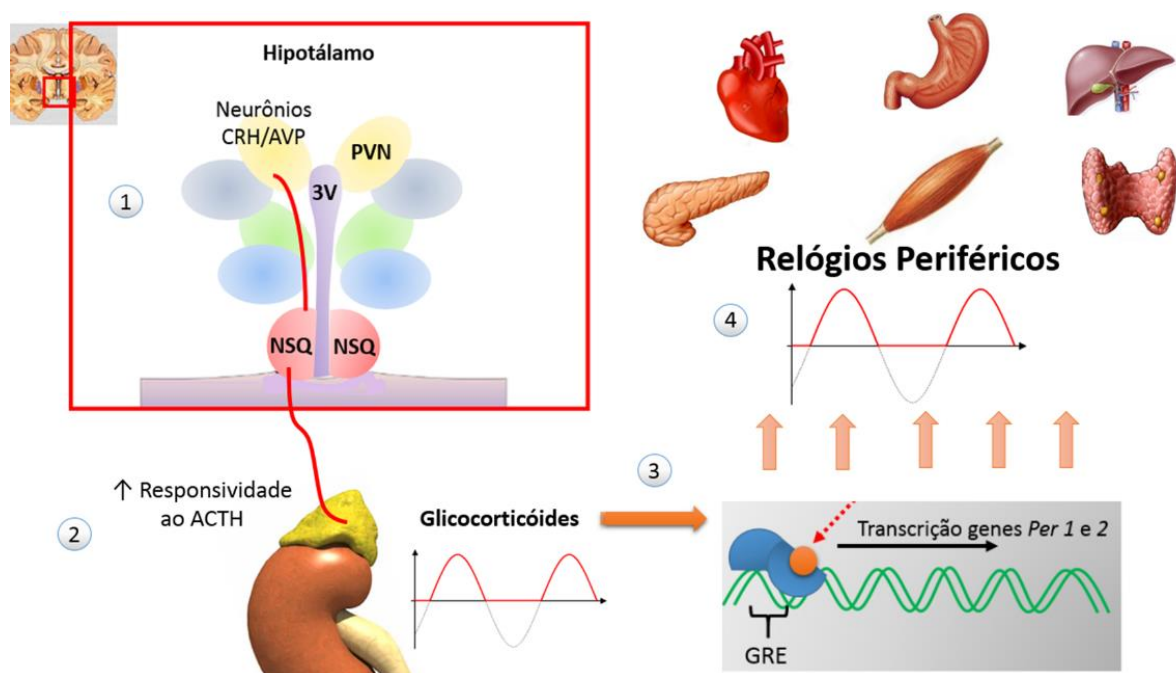


Figura 4: Integração entre glicocortíóides e ritmos circadianos. (1) O NSQ emite projeções para neurônios CRH e AVP no PVN ditando o ritmo de suas secreções. (2) Do NSQ também parte inervação simpática até a adrenal, tornando-a mais responsiva ao ACTH. Ambas comunicações contribuem para os ritmos de secreção dos glicocorticoides. (3) Estes, por sua vez, podem ligar-se aos elementos GRE encontrados nos genes relógios *Per1* e *2*, (4) influenciando a expressão de alguns genes relógios. Os glicocorticoides podem agir como sinal humoral capaz de sincronizar o NSQ com os relógios periféricos. Figuras baseadas em informações de Bao e colaboradores [146], Kalsbeek e colaboradores [147], Balsalobre e colaboradores [149].

Um comportamento alimentar apropriado é essencial para a sobrevivência dos animais. Este comportamento pode ser coordenado por uma variedade de condições ambientais, tais como ciclo claro/escuro e disponibilidade de alimento, além dos estados fisiológicos internos, como funções gastrintestinais e balanço energético [152]. Alguns animais em determinados momentos do dia podem se tornar presas em potencial. Em virtude disso, os animais herbívoros adaptam seu comportamento de forrageio para os momentos do dia em que há menor probabilidade de encontrar predadores. Já os animais carnívoros, tem seu comportamento de forrageio programado para os horários onde há maior disponibilidade de presas [153]. Essa capacidade de antecipar o período da refeição tem sido encontrada em uma grande variedade de animais. Em experimentação animal, este fenômeno é evidenciado quando a disponibilidade de alimento é restrita para poucas horas por período do dia, e quando esse regime é mantido, onde ratos exibem um conjunto de modificações comportamentais e fisiológicas, horas antes do momento da refeição [152], fenômeno atualmente conhecido como Atividade Antecipatória Alimentar – AAA (food-antecipatory activity) [154]. A AAA caracteriza-se pelo aumento do comportamento exploratório e de forrageio [153], aumento da temperatura corporal, níveis de glicocorticoides plasmáticos, motilidade gastrintestinal e atividade de enzimas digestivas, que permanecem mesmo na ausência de qualquer sincronizador externo [155]. Estas modificações aperfeiçoam a ingestão alimentar e facilitam o uso dos nutrientes, levando a suposição que um relógio sincronizado pelo alimento assegura que o organismo obtenha energia suficiente até mesmo quando o alimento torna-se restrito [143].

O comportamento alimentar e o controle do balanço energético é um bom exemplo de função fisiológica que antecipa um acontecimento diário, assim, o organismo prepara-se em antecipação a uma refeição, que na disponibilidade de alimentos, desenvolve ciclos de fome, saciedade e saciação, evidenciando que o controle do comportamento alimentar é um sistema passível de regulação circadiana. De fato, as evidências são muitas, e estudos apontam que vários dos sinais centrais e periféricos que regulam o balanço energético, variam seus níveis em

ciclos de aproximadamente 24 horas. A leptina, bem como seus receptores hipotalâmicos, apresentam uma variação nas suas expressões respeitando este mesmo ciclo [156]. Assim como a insulina também apresenta suas variações diárias a depender dos níveis circulantes da melatonina [157]. E ainda, a grelina, outro sinal periférico, apresenta na região promotora de seus genes o elemento E-box, apresentando por isso, uma expressão circadiana [158]. Quanto aos sinais centrais, os neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos, apresentam oscilações num período de 24 horas em suas atividades. Assim como a grelina, o CART também apresenta o elemento e-box na região promotora do gene que o codifica, tendo como consequência uma expressão ritmica [159]. Os níveis de NPY apresentam um pico no início do ciclo escuro em ratos, que antecipa o pico do consumo alimentar desses animais [160], e observação semelhante é feita em relação ao AgRP [161].

A exemplo do desenvolvimento de sobrepeso e obesidade por mudanças no turno de trabalho e dessincronização nos períodos de alimentação, observado na Síndrome do Comer Noturno, pode-se inferir, que disfunções no sistema de geração dos ritmos circadianos possam estar envolvidas na etiologia da obesidade. Visto as evidências do envolvimento dos ritmos circadianos com o controle comportamento alimentar, sugere-se o desequilíbrio no balanço energético observado na obesidade, possam ocorrer em resposta a alterações em alguns dos componentes envolvidos com os relógios biológicos. De fato, alguns recentes estudos tem apontado esta relação com o surgimento de relevantes evidências, emergindo uma linha de pesquisa cuja perspectiva é promissora.

2.5.1-Envolvimento dos ritmos circadianos e receptores Rev-erba com o metabolismo e balanço energético:

Como mencionado anteriormente, dentre os componentes da maquinaria molecular dos ritmos circadianos está o gene do “*orphan* receptor nuclear” REV-ERBa. Inicialmente, este receptor recebeu a classificação de “*orphan receptor*” pelo fato de não ter sido identificado seus ligantes endógenos. Entretanto, hoje se sabe que o receptor Rev-erba, apresenta sítios de ligação para pequenas moléculas, como o heme. A redução dos níveis celular desta molécula acarreta redução da atividade do receptor REV-ERBa [162]. De um modo geral, é atribuída como função desses receptores, a de fator transcrricional repressor. Ambos receptores, REV-ERBa e β não apresentam a região α -hélice C-terminal em seus domínios de ligação, tornando-os

incapazes de ativar a expressão gênica [163]. REV-ERB α reprime a expressão de seus genes alvo através do recrutamento do receptor nuclear co-repressor 1 (NCoR) e a classe de histonas desacetilase 3 (HDAC3) para a região promotora [164] (Figura 5). A ação desses receptores pode visar tanto mecanismos regulatórios dos relógios circadianos, como mecanismos, que não regulam os relógios [165]. A primeira já é bem descrita, trata-se da repressão da transcrição do gene *Bmal1*, contribuindo para o feedback transcricional translacional [141]. Já a segunda, inclui a ação do REV-ERB α sobre o metabolismo dos lipídeos [165], dos carboidratos [166], entre outros. Provavelmente, essa ação em mecanismos distintos é o que resulta em integração entre o Sistema circadiano e o metabolismo energético, que é atribuída ao REV-ERB α . O gene que codifica o Rev-erb apresenta em sua região promotora o elemento RevDR-2, esta região é reconhecida por outros fatores transcricionais que também são receptores nucleares, como o PPAR e o Ror α ativando sua transcrição. A depender das modificações pós translacionais da proteína REV-ERB, pode formar homodímeros que reconhecem o elemento RevDR-2 reprimindo a transcrição de seu próprio gene, ou na forma de monômeros que se ligam aos elementos RevRE da região promotora dos genes alvo [167] (Figura 5). Este último elemento, RevRE, também é reconhecido pelo receptor nuclear PPAR, sugerindo que o Rev-erb pode transduzir alguns efeitos fisiológicos do PPAR, como a transcrição de seus genes alvo [168].

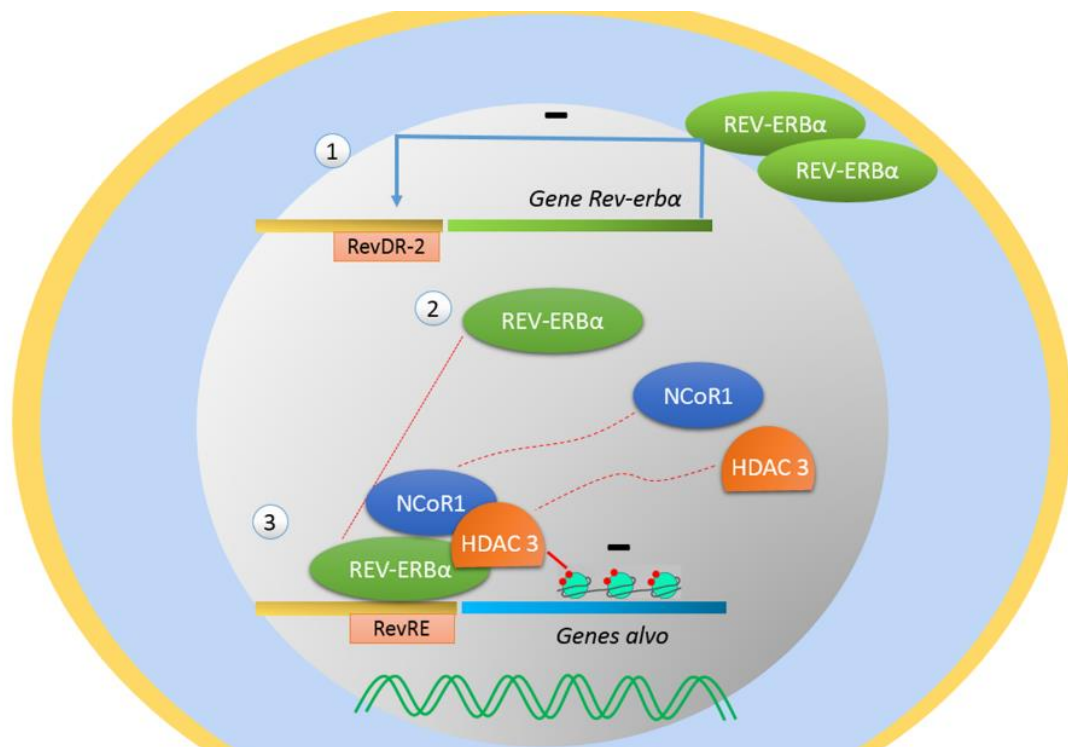


Figura 5: Ação dos receptores REV-ERB α . (1) Podem agir como homodímeros ou monômeros. Como homodímeros, agem reprimindo a transcrição do próprio gene. (2) Como monômeros, agem em outros

genes-alvo, (3) e ao se ligarem a eles, recrutam o NCoR1 e HDAC 3, reprimindo a transcrição dos mesmos. Figura baseada em informações de Raspe e colaboradores [164].

A expressão da apolipoproteína apoA-1 no fígado, principal constituinte das lipoproteínas de alta densidade, HDL, é reprimida pelo Rev-erb α em ratos [169]. O REV-ERB α também atua reprimindo a transcrição do gene da apolipoproteína apoC-III tanto em humanos como em ratos [170]. A expressão da apoC-III vem sendo positivamente correlacionada com o risco de doenças cardiovasculares e o REV-ERB α provavelmente atua como um fator determinante no risco de arterosclerose [168]. *In vivo*, camundongos deficientes do gene Rev-erb α apresentaram aumento na expressão hepática da apoC-III, triglicérides e VLDL plasmáticos [171]. Tanto os genes da apoA-I como apoC-III tem suas expressões influenciadas também pelo receptor nuclear ROR α , de modo que enquanto o Rev-erb reprime suas transcrições, o Ror a estimula [170]. Similarmente, o REV-ERB também reprime a transcrição da enzima enoylCoA hidratase/3-hidroxiacylCoA dehidrogenase envolvida na β oxidação peroxissomal [172]. Por outro lado, a arterosclerose também é caracterizada por um processo inflamatório da parede vascular, bem como a presença de macrófagos. O receptor REV-ERB α é expresso tanto nas células da parede vascular como nos macrófagos [173]. Em macrófagos humanos, a ativação deste receptor reprime a transcrição do receptor Toll-like, que se liga a lipopolissacarídeos, diminuindo a produção de citocinas em resposta aos níveis de lipopolissacarídeos. Este resultado evidencia a ação anti-inflamatória dos receptores REV-ERB α [165], e sugerem um impacto positivo num possível tratamento da arterosclerose. Na mesma linha, estudos apontam que o receptor também atua como um regulador diminuindo os níveis do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), agindo portanto como um inibidor da cascata de fibrinólise que pode promover o desenvolvimento de arterotrombose [174].

Além do metabolismo lipídico, o REV-ERB α , encontra-se envolvido com processos fisiológicos dos adipócitos, onde sua expressão em pré-adipócitos 3T3L1 promove sua diferenciação em adipócitos maduros e aumento do estoque de lipídeos [165]. Este efeito do Rev-erb sobre a adipogênese pode ser exacerbada pelo tratamento com ligantes do PPAR, de modo que o Rev-erb tem sua expressão aumentada e transduz algumas das funções fisiológicas do PPAR por induzir a expressão de alguns genes alvo deste último [168]. Entretanto, não é apenas o metabolismo lipídico que recebe influências do receptor REV-ERB α , mas também o da glicose. Yin e colaboradores demonstraram que a ativação do receptor Rev-erb α promove repressão da expressão do gene Pepck, que codifica a Pep-carboxilase, uma enzima

mitocondrial que participa de uma das etapas da gliconeogênese, em células de hepatoma humano. Embora os mecanismos sejam ainda desconhecidos, a repressão deste gene sugere que a ativação do receptor REV-ERB α seja capaz de modificar os níveis circulantes de glicose plasmática ao longo do dia [166]. Em associação, foi demonstrado que o silenciamento dos genes do Rev-erb α , através da utilização de sondas siRNA, em cultura de células TC1-9 pancreáticas de humanos, demonstrou uma redução na liberação de glucagon [176], influenciando igualmente os níveis plasmáticos de glicose.

Frente à essas inter-relações, sugere-se que alterações na expressão dos genes que codificam esses receptores nucleares possam estar relacionadas às alterações metabólicas. Embora o mecanismo ainda não tenha sido elucidado, sugere-se que as inter-relações entre mudanças de turno na alimentação, sono com o ganho de peso resulte em parte de um mecanismo alterado envolvendo estes receptores, visto que o mesmo também está ligado diretamente com os ritmos circadianos [168]. Nesse sentido, estudos ainda precisam ser feitos na tentativa de melhor compreender as relações entre o sistema circadiano no tecido adiposo, a síntese circadiana da leptina e de enzimas, da lipólise e liberação circadiana de ácidos graxos com os mecanismos envolvidos com o controle central da saciedade e consumo alimentar. Tais alterações em vias metabólicas envolvendo o metabolismo dos lipídeos e carboidratos pode resultar em diversas desordens como obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e eventualmente diabetes tipo 2 e hipertensão, que em conjunto caracterizam a síndrome metabólica. Alguns estudos epidemiológicos vêm sendo publicados demonstrando uma relação direta entre polimorfismos do gene codificador do receptor REV-ERB α e fenótipo de obesidade e síndrome metabólica em adolescentes e adultos [177] bem como na população espanhola [178], norte americana e mediterrânea [179].

Recentemente, em um estudo publicado por Solt e colaboradores (2012), a utilização de agonistas sintéticos para os receptores nucleares REV-ERB α e REV-ERB β , SR9009 e SR9011 respectivamente, administrados por via intraperitoneal, resultou em diminuição nos níveis de expressão de genes lipogênicos e elevados níveis de enzimas responsáveis pela oxidação de glicose e ácidos graxos e o transporte de ácidos graxos no músculo esquelético. No tecido adiposo branco, a expressão dos genes associados ao estoque de lipídeos no fígado foi comparavelmente reduzido, resultando em perda da massa gorda e melhorando o perfil metabólico com redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol total, glicose e insulina em camundongos obesos. Adicionalmente, estes resultados foram acompanhados por redução da atividade locomotora no ciclo escuro sem redução no consumo alimentar, sugerindo

que estes efeitos benéficos sobre o peso corporal e perfil metabólico estão associado ao aumento do consumo de oxigênio pelo metabolismo basal [180]. Entretanto, Woldt e colaboradores demonstraram que camundongos portadores de deficiência nos receptores REV-ERB α (Rev-erb α -/-) apresenta diminuição na capacidade muscular e portanto na eficiência da atividade física e redução na função e no conteúdo de mitocôndrias na fibra muscular. Em contrapartida, a ativação farmacológica dos receptores REV-ERB α resulta em aumento da função e biogênese mitocondrial no tecido muscular, bem como em melhora do rendimento da atividade física, chegando a sugerir que a ativação destes receptores pode resultar em melhora nos processos de metabolismo oxidativo mitocondrial e de capacidade física [181]. Em um estudo epidemiológico, Garaulet e colaboradores demonstraram uma relação diretamente proporcional entre polimorfismos no gene codificador do receptor nuclear REV-ERB α e fenótipo de obesidade. Os autores deste estudo sugerem que este polimorfismo esteja mais relacionado com alterações na capacidade e eficiência da atividade física que com o aumento do consumo alimentar, embora a este polimorfismo, quando presentes em dois alelos, homozigotos, o alto consumo de ácidos graxos monoinsaturados não previna o aumento do IMC, oposto ao que acontece com indivíduos portadores de apenas um alelo mutante do gene Rev-erb α , ou indivíduos não portadores de alelos mutantes [179].

Tomados juntos, todos estes estudos nos revelam fortes evidências do envolvimento dos receptores nucleares Rev-erb α na fisiopatologia da obesidade, abrindo campo para uma nova linha de pesquisa inter-disciplinar, a influência dos ritmos circadianos sobre a gênese da obesidade. Embora alguns estudos mostrem o envolvimento destes receptores nucleares com o metabolismo, pouco se sabe acerca de seu envolvimento e influência sobre o controle do balanço energético presente no hipotálamo. Torna-se necessário então, o desenvolvimento de estudos cujo o objetivo inclua a análise dos efeitos da ativação central dos receptores REV-ERB α e seus efeitos sobre o consumo e gasto energético.

2.6- Referencias:

1. Skotheim B, Larsen BI, Siem H. The World Health Organization and global health. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*. 2011;131(18):1793-5.
2. Fontaine KR, Barofsky I. Obesity and health-related quality of life. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2001;2(3):173-82.
3. Ardern CI, Katzmarzyk PT, Janssen I, Ross R. Discrimination of health risk by combined body mass index and waist circumference. *Obesity research*. 2003;11(1):135-42.
4. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(3):379-84.
5. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366(9491):1059-62.
6. Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(9):1431-7.
7. Pesquisa de Orçamento Familiares 2008- 2009 (POF). Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Diretoria de pesquisas (Coordenação de trabalho e orçamento) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).
8. Vigitel Brasil 2009: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010.
9. Wolf AM, Colditz GA. Current estimates of the economic cost of obesity in the United States. *Obesity Research*. 1998; 6: 97-106.
10. Hammond RA, Levine R. The economic impact of obesity in the United States. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2010;3:285-95
11. Quesenberry CP, Caan B, Jacobson A. Obesity, health services use, and health care costs among members of a health maintenance organization. *Arch Int Med*. 1998; 158: 466-72.
12. Bahia L, Coutinho ES, Barufaldi LA, Abreu Gde A, Malhão TA, de Souza CP, Araujo DV. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2012;12:440.
13. Leonard WR, Snodgrass JJ, Robertson ML. Effects of brain evolution on human nutrition and metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:311-27.
14. Simoupolos AP. Genetic variation and evolutionary aspects of diet. In: Papaya, editor. *Antioxidants in nutrition and health*. Boca Raton: CRC Press; 1999;.65-88
15. Eaton SB, Konner M. Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *N Engl J Med*. 1985;312:283-9
16. FAO, WFP and IFAD. 2012. The State of Food Insecurity in the World 2012. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition. Rome.

17. McCance RA, Widdowson EM. The determinants of growth and form. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1974;185(1078):1-17.
18. Dobbing J. The influence of early nutrition on the development and myelination of the brain. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1964;159:503-9.
19. Gluckman P, Hanson M. Echoes of the past: Evolution, development, health and disease. *Discov Med.* 2004;4(24):401-7
20. Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol.* 2004;561(Pt 2):355-77.
21. Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25 Suppl 5:S637.
22. Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, et al. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron.* 1998;21(6):1375-85.
23. Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature.* 1998;393(6680):72-6.
24. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(25):15043-8.
25. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.* 1999;20(1):68-100.
26. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 1995;269(5223):543-6.
27. Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, et al. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides.* 2002;23(3):531-6.
28. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 2000;407(6806):908-13.
29. Ekblad E, Sundler F. Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY. *Peptides.* 2002;23(2):251-61.
30. Larsson LI, Sundler F, Hakanson R. Immunohistochemical localization of human pancreatic polypeptide (HPP) to a population of islet cells. *Cell Tissue Res.* 1975;156(2):167-71.
31. Adrian TE, Savage AP, Sagor GR, Allen JM, Bacarese-Hamilton AJ, Tatemoto K, et al. Effect of peptide YY on gastric, pancreatic, and biliary function in humans. *Gastroenterology.* 1985;89(3):494-9.

32. Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 1973;84(3):488-95.
33. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M & Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature Genetics.* 1998;18 213–215.
34. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E & Flier JS. Role of leptina in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 1996;382 250–252.
35. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D & Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science.* 200; 289 2122–2125.
36. Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, Schwartz MW, Basdevant A & Weigle DS Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nature Medicine.* 2002;8 643–644.
37. McLaughlin CL, Baile CA & Buonomo FC. Effect of CCK antibodies on food intake and weight gain in Zucker rats. *Physiology and Behavior.* 1985;34 277–282.
38. Zipf WB, O'Dorisio TM, Cataland S & Dixon K. Pancreatic polypeptide responses to protein meal challenges in obese but otherwise normal children and obese children with Prader-Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1983;57 1074–1080.
39. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghatei MA & Bloom SR. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3–36. *New England Journal of Medicine.* 2003; 349 941–948.
40. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G & Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics.* 1998; 19 155–157
41. Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature.* 1994;371 799–802.
42. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science.* 2005;308(5724):1043-5.
43. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet.* 2006;367:1605–1617.
44. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, et al. A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:637–644
45. Ilias I, Torpy DJ, Pacak K, et al. Cushing's syndrome due to ectopic corticotrophin secretion: twenty years experience at National Institutes of Health. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:4955–4962.

46. Shibli-Rahhal, M. Van Beek, J.A. Shlechte, Cushing's syndrome, Clin. Dermatol. 24(4) 2006; 260-265.
47. Baid SK, Nieman LK. Therapeutic doses of glucocorticoids: implications for oral medicine, Oral Dis. 12 (5) 2006; 436-442.
48. McEwen, B. S. Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. Eur. J. Pharmacol. 2008; 583,174–185.
49. Richard, D., Lin, Q., and Timofeeva, E. The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. Eur. J. Pharmacol. 2002; 440,189–197.
50. Bjorntorp, P. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? Obes. Rev. 2001; 2,73–86.
51. Shimizu, H., Arima, H., Watanabe, M., Goto, M., Banno, R., Sato, I. Glucocorticoids increase neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling in the arcuate nucleus of rats. Endocrinology. 2008; 149,4544–4553.
52. Zakrzewska, K. E., Cusin, I., Sainsbury, A., Rohner-Jeanrenaud, F., and Jeanrenaud, B. Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance. Diabetes. 1997;46, 717–719.
53. Asensio, C., Muzzin, P., and Rohner-Jeanrenaud, F. Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 2004;28(Suppl. 4)45–52.
54. Foster, M. T., Warne, J. P., Ginsberg, A. B., Horneman, H. F., Pecoraro, N. C., Akana, S. F., et al. Palatable foods, stress, and energy stores sculpt corticotropin-releasing factor, adrenocorticotropin, and corticosterone concentrations after restraint. Endocrinology. 2009 150, 2325–2333.
55. Peters, A., Kubera, B., Hubold, C., Langemann, D. The selfish brain: stress and eating behavior. Front. Neurosci. 2011; 5:74.
56. Sharifian A, Farahani S, Pasalar P. Shift work as an oxidative stressor. J Circadian Rhythms. 2005, 3, 15.
57. Beersma DG & Gordijn MC. Circadian control of the sleep–wake cycle. Physiol Behav. 2007;90:190–195.
58. van Amelsvoort LG, Schouten EG & Kok FJ. Duration of shiftwork related to body mass index and waist to hip ratio. Int J Obes Relat Metab Disord. 1999;23: 973–978.
59. Di Lorenzo L, De Pergola G, Zocchetti C. Effect of shift work on body mass index: results of a study performed in 319 glucose-tolerant men working in a Southern Italian industry. Int J Obes Relat Metab Disord. 2003;27:1353–1358

60. Romon M, Edme JL, Boulenguez C. Circadian variation of diet-induced thermogenesis. *Am J Clin Nutr.* 1993;57:476–480
61. Crispin CA, Zalcman I, Da ´tilo M. The influence of sleep and sleep loss upon food intake and metabolism. *Nutr Res Ver.* 2007;20:195–212
62. Morikawa Y, Nakagawa H, Miura K. Shift work and the risk of diabetes mellitus among Japanese male factory workers. *Scand J Work Environ Health.* 2005;31:179–183.
63. Morikawa Y, Nakagawa H, Miura K. Relationship between shift work and onset of hypertension in a cohort of manual workers. *Scand J Work Environ Health.* 1999;25:100–104.
64. Whitehead DC, Thomas H Jr & Slapper DR. A rational approach to shift work in emergency medicine. *Ann Emerg Med.* 1992;21:1250–1258.
65. O’Reardon JP, Ringel BL, Dinges DF, Allison KC, Rogers NL, Martino NS, Stunkard AJ. Circadian eating and sleeping patterns in the night eating syndrome. *Obes Res.* 2004; 12:1789–1796.
66. Marshall HM, Allison KC, O’Reardon JP, Birketvedt G, Stunkard AJ. Night eating syndrome among nonobese persons. *Int J Eat Disord* 2004; 35: 217–222.
67. Schwandt B, de Zwaan M, Jager B. Co-morbidity between type 2 diabetes mellitus and night eating. *Psychother Psychosom Med Psychol.* 2012;62(12):463–468
68. Goel N, Albert J. Stunkard, Naomi L. Rogers, Hans P.A. Van Dongen, Kelly C. Allison, John P. O’Reardon, Rexford S. Ahima, David E. Cummings, Moonseong Heo||, and David F. Dinges. Circadian Rhythm Profiles in Women with Night Eating Syndrome. *J Biol Rhythms.* 2009; 24(1): 85–94.
69. Macfarlane DP, Forbes S, Walker BR. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: Fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol.* 2008;197: 189-204.
70. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immunemediated inflammation. *N Engl J Med* 1995;332: 1351-1362.
71. Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature.*1982;299: 355-357.
72. Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: Comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci.* 1995;15: 6340-6350.
73. Antoni FA, Holmes MC, Makara GB, Karteszi M, Laszlo FA. Evidence that the effects of arginine-8-vasopressin (AVP) on pituitary corticotropin (ACTH) release are mediated by a novel type of receptor. *Peptides.* 1984;5: 519-522.
74. Gagner, J P, Drouin J. Opposite regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription by glucocorticoids and CRH. 1985; 25–32.
75. Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N. Regulation of ACTH secretion: Variations on a theme of B. *Recent Prog Horm Res.* 1987;43:113-173.

76. Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol.* 1994;8:1298-1308.
77. Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endoc Rev.* 1996;17: 221-244.
78. Lin D, Sugawara T, Strauss JF, III, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science.* 1995;267:1828-1831.
79. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell.* 1995;83: 835-839.
80. Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 1985;117: 2505-2511.
81. Spencer RL, Miller AH, Moday H, Stein M, McEwen BS. Diurnal differences in basal and acute stress levels of type I and type II adrenal steroid receptor activation in neural and immune tissues. *Endocrinology.* 1993;133:1941-1950.
82. Nishi M, Kawata M. Brain corticosteroid receptor dynamics and trafficking: Implications from live cell imaging. *Neuroscientist.* 2006;12: 119- 133.
83. Wozniak GM, Ruegg J, Abel GA, Schmidt U, Holsboer F, Rein T. FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2005;280: 4609-4616.
84. Schoneveld OJ, Gaemers IC, Das AT, Hoogenkamp M, Renes J, Ruijter JM, Lamers WH. Structural requirements of the glucocorticoid-response unit of the carbamoyl-phosphate synthase gene. *Biochem J.* 2004;382(Pt 2):463-70.
85. London E, Castonguay TW. Diet and the role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 on obesity. *J Nutr Biochem.* 2009;20(7):485-93.
86. De Sousa Peixoto RA, Turban S, Battle JH, Chapman KE, Seckl JR, Morton NM. Preadipocyte 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is a keto-reductase and contributes to diet-induced visceral obesity in vivo. *Endocrinology.* 2008;149(4):1861-8.
87. Walker BR, Andrew R. Tissue production of cortisol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and metabolic disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1083:165-84.
88. Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev.* 2004;25(5):831-66.
89. Jones MT, Hillhouse EW, Burden JL. Dynamics and mechanics of corticosteroid feedback at the hypothalamus and anterior pituitary gland. *J Endocrinol.* 1977;73: 405-417.

90. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10: 397-409.
91. Lovas JG, Lovas DA. Rapid relaxation--practical management of preoperative anxiety. *Tex Dent J.* 2007;124(11):1120-5.
92. Wardle J, Steptoe A, Oliver G, Lipsey Z. Stress, dietary restraint and food intake. *J Psychosom Res.* 2000;48(2):195-202.
93. Pollard TM, Steptoe A, Canaan L, Davies GJ, Wardle J. Effects of academic examination stress on eating behavior and blood lipid levels. *Int J Behav Med.* 1995;2(4):299-320.
94. Greeno CG, Wing RR. Stress-induced eating. *Psychol Bull.* 1994;115(3):444-64.
95. Newman E, O'Connor DB, Conner M. Daily hassles and eating behaviour: the role of cortisol reactivity status. *Psychoneuroendocrinology.* 2007;32(2):125-32.
96. Singh A, Petrides JS, Gold PW, Chrousos GP, Deuster PA. Differential hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity to psychological and physical stress. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(6):1944-8.
97. Santana P, Akana SF, Hanson ES, Strack AM, Sebastian RJ, Dallman MF. Aldosterone and dexamethasone both stimulate energy acquisition whereas only the glucocorticoid alters energy storage. *Endocrinology.* 1995;136(5):2214-22.
98. Devenport L, Knehans A, Thomas T, Sundstrom A. Macronutrient intake and utilization by rats: interactions with type I adrenocorticoid receptor stimulation. *Am J Physiol.* 1991;260(1 Pt 2):R73-81.
99. Tempel, DL, Leibowitz, SF. Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism, *J. Neuroendocrinol.* 6, 1994. 479–501.
100. Liu XY, Shi JH, DU WH, Fan YP, Hu XL, Zhang CC, Xu HB, Miao YJ, Zhou HY, Xiang P, Chen FL. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. *Exp Ther Med.* 2011;2(5):977-984.
101. Jahng JW, Kim NY, Ryu V, Yoo SB, Kim BT, Kang DW, Lee JH. Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats. *Eur J Pharmacol.* 2008;581(1-2):64-70.
102. Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., and Monteggia, L. M. Neurobiology of depression. *Neuron.* 2002, 34, 13–25.
103. Richardson RD, Omachi K, Kermani R, Woods SC. Intraventricular insulin potentiates the anorexic effect of corticotropin releasing hormone in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;283(6):R1321-6.
104. Benoit SC, Thiele TE, Heinrichs SC, Rushing PA, Blake KA, Steeley RJ. Comparison of central administration of corticotropin-releasing hormone and urocortin on food intake, conditioned taste aversion, and c-Fos expression. *Peptides.* 2000;21(3):345-51.

105. Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL, Koob GF. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res.* 1993;611(1):18-24.
106. Al-Barazanji KA, Miller JE, Rice SQ, Arch JR, Chambers JK. C-terminal fragments of ACTH stimulate feeding in fasted rats. *Horm Metab Res.* 2001;33(8):480-5.
107. Schulz C, Paulus K, Lobmann R, Dallman M, Lehnert H. Endogenous ACTH, not only alpha-melanocyte-stimulating hormone, reduces food intake mediated by hypothalamic mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(2): E237-44
108. Corder R, Waeber B, Evequoz D, Nussberger J, Gaillard R, Brunner H. Effect of ganglion blockade with pentolinium on circulating neuropeptide Y levels in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988;12(2):140-3.
109. Lee B, Kim SG, Kim J, Choi KY, Lee S, Lee SK, Lee JW. Brain-specific homeobox factor as a target selector for glucocorticoid receptor in energy balance. *Mol Cell Biol.* 2013;33(14):2650-8.
110. Uchoa ET, Silva LE, de Castro M, Antunes-Rodrigues J, Elias LL. Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. *Neuropeptides.* 2012;46(3):119-24.
111. Savontaus E, Conwell IM, Wardlaw SL. Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. *Brain Res.* 2002;958(1):130-8.
112. Slieker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem.* 1996;271(10):5301-4.
113. Drazen DL, Wortman MD, Schwartz MW, Clegg DJ, van Dijk G, Woods SC, Seeley RJ. Adrenalectomy alters the sensitivity of the central nervous system melanocortin system. *Diabetes.* 2003;52(12):2928-34.
114. Tataranni PA, Larson DE, Snitker S, Young JB, Flatt JP, Ravussin E. Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *Am J Physiol.* 1996;271(2 Pt 1):E317-25.
115. Binnert C, Ruchat S, Nicod N, Tappy L. Dexamethasone-induced insulin resistance shows no gender difference in healthy humans. *Diabetes Metab.* 2004;30(4):321-6.
116. Nicod N, Giusti V, Besse C, Tappy L. Metabolic adaptations to dexamethasone-induced insulin resistance in healthy volunteers. *Obes Res.* 2003;11(5):625-31.
117. Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun.* 2005;19(4):275-80.
118. Zheng J, Dobner A, Babygirija R, Ludwig K, Takahashi T. Effects of repeated restraint stress on gastric motility in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(5):R1358-65.

- 119.Smith SR, de Jonge L, Pellymounter M, Nguyen T, Harris R, York D, Redmann S, Rood J, Bray GA. Peripheral administration of human corticotropin-releasing hormone: a novel method to increase energy expenditure and fat oxidation in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(5):1991-8.
- 120.Brillon DJ, Zheng B, Campbell RG, Matthews DE. Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans. *Am J Physiol.* 1995;268(3 Pt 1):E501-13.
- 121.Short KR, Nygren J, Bigelow ML, Nair KS. Effect of short-term prednisone use on blood flow, muscle protein metabolism, and function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(12):6198-207.
- 122.Leitch CA, Ahlrichs J, Karn C, Denne SC. Energy expenditure and energy intake during dexamethasone therapy for chronic lung disease. *Pediatr Res.* 1999;46(1):109-13.
- 123.Silva JE. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid.* 1995;5(6):481-92.
- 124.Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, Lee EW, Burnett MS, Fricke ST, Kvetnansky R, Herzog H, Zukowska Z. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med.* 2007;13(7):803-11. Epub 2007 Jul 1.
- 125.Rosmond R, Chagnon YC, Chagnon M, Périusse L, Bouchard C, Björntorp P. A polymorphism of the 5'-flanking region of the glucocorticoid receptor gene locus is associated with basal cortisol secretion in men. *Metabolism.* 2000;49(9):1197-9.
- 126.Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet.* 1998;19(2):155-7.
- 127.White PC. Genotypes at 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 11B1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase loci are not risk factors for apparent cortisone reductase deficiency in a large population-based sample. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(10):5880-3.
- 128.Huizenga NA, de Lange P, Koper JW, Clayton RN, Farrell WE, van der Lely AJ, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SW. Human adrenocorticotropin-secreting pituitary adenomas show frequent loss of heterozygosity at the glucocorticoid receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):917-21.
- 129.van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:333-57.
- 130.Takahashi JS. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci.* 1995;18:531-53.
- 131.Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 2002;418(6901):935-41.

- 132.Schibler U, Sassone-Corsi P. A web of circadian pacemakers. *Cell*. 2002;111(7):919-22
- 133.Sakamoto K, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, Tanaka H. Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem*. 1998;273(42):27039-42.
- 134.Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:407-41.
- 135.Froy O. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol*. 2007;28(2-3):61-71.
- 136.Etchegaray JP, Lee C, Wade PA, Reppert SM. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature*. 2003;421(6919):177-82.
- 137.Hastings MH, Herzog ED. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Rhythms*. 2004;19(5):400-13.
- 138.Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*. 2002;109(3):307-20.
- 139.Mendoza J, Revel FG, Pevet P, Challet E. Shedding light on circadian clock resetting by dark exposure: differential effects between diurnal and nocturnal rodents. *Eur J Neurosci*. 2007;25(10):3080-90.
- 140.Sumova A, Bendova Z, Sladek M, El-Hennamy R, Mateju K, Polidarova L, et al. Circadian molecular clocks tick along ontogenesis. *Physiol Res*. 2008;57 Suppl 3:S139-48.
- 141.Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. 2002;110(2):251-60.
- 142.Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 2004;43(4):527-37.
- 143.Mendoza JY, Dardente H, Escobar C, Pevet P, Challet E. Dark pulse resetting of the suprachiasmatic clock in Syrian hamsters: behavioral phase-shifts and clock gene expression. *Neuroscience*. 2004;127(2):529-37.
- 144.Torres-Farfan C, Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M. A circadian clock entrained by melatonin is ticking in the rat fetal adrenal. *Endocrinology*. 2011;152(5):1891900.
- 145.Chrousos GP. Adrenal suppression versus clinical glucocorticoid deficiency in the premature infant: no simple answers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):473-4.
- 146.Bao AM, Meynen G, Swaab DF. The stress system in depression and neurodegeneration: Focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev*. 2008; 57:531–553.

- 147.Kalsbeek A, Fliers E, Hofman MA, Swaab DF, Buijs RM. Vasopressin and the output of the hypothalamic biological clock. *J Neuroendocrinol.* 2010;22(5):362-72.
- 148.Kaneko M, Kaneko K, Shinsako J, Dallman MF. Adrenal sensitivity to adrenocorticotropin varies diurnally. *Endocrinology.* 1981;109(1):70-5.
- 149.Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science.* 2000;289(5488):2344-7.
- 150.Yamamoto T, Nakahata Y, Tanaka M, Yoshida M, Soma H, Shinohara K. Acute physical stress elevates mouse period1 mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J Biol Chem.* 2005;280(51):42036-43.
- 151.So AY, Bernal TU, Pillsbury ML, Yamamoto KR, Feldman BJ. Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(41):175827.
- 152.Poulin AM, Timofeeva E. The dynamics of neuronal activation during food anticipation and feeding in the brain of food-entrained rats. *Brain Res.* 2008;1227:128-41.
- 153.Stephan FK. The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms.* 2002;17(4):284-92.
- 154.Stephan FK. Broken circadian clocks: a clock gene mutation and entrainment by feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285(1):R32-3.
- 155.Honma K, Honma S, Hiroshige T. Activity rhythms in the circadian domain appear in suprachiasmatic nuclei lesioned rats given methamphetamine. *Physiol Behav.* 1987;40(6):767-74.
- 156.Stutz AM, Staszkiwicz J, Ptitsyn A, Argyropoulos G. Circadian expression of genes regulating food intake. *Obesity (Silver Spring).* 2007;15(3):607-15.
- 157.Muhlbauer E, Albrecht E, Bazwinsky-Wutschke I, Peschke E. Melatonin influences insulin secretion primarily via MT(1) receptors in rat insulinoma cells (INS-1) and mouse pancreatic islets. *J Pineal Res.* 2012;52(4):446-59.
- 158.Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, et al. Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology.* 2004;145(9):4144-53.
- 159.Yamada K, Yuan X, Otabe S, Koyanagi A, Koyama W, Makita Z. Sequencing of the putative promoter region of the cocaine- and amphetamine-regulated-transcript gene and identification of polymorphic sites associated with obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26(1):132-6.
- 160.Akabayashi A, Levin N, Paez X, Alexander JT, Leibowitz SF. Hypothalamic neuropeptide Y and its gene expression: relation to light/dark cycle and circulating corticosterone. *Mol Cell Neurosci.* 1994;5(3):210-8.

161. Lu XY, Shieh KR, Kabbaj M, Barsh GS, Akil H, Watson SJ. Diurnal rhythm of agouti-related protein and its relation to corticosterone and food intake. *Endocrinology*. 2002;143(10):3905-15.
162. Raghuram S, Stayrook KR, Huang P, Rogers PM, Nosie AK, McClure DB, Burris LL, Khorasanizadeh S, Burris TP, Rastinejad F. Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β . *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(12):1207-13.
163. Woo, E.J., Jeong, D.G., Lim, M.Y., Jun Kim, S., Kim, K.J., Yoon, S.M., Park, B.C., and Ryu, S.E. Structural insight in to the constitutive repression function of the nuclear receptor Rev-erb, *J. Mol. Biol*. 2007;373,735–744
164. Raspe, E., Duez, H., Mansen, A., Fontaine, C., Fievet, C., Fruchart, J. C., Vennstrom, B., and Staels, B. Identification of Rev-erb as a physiological repressor of apoC-III gene transcription, *J. Lipid Res*. 2002.43,2172–2179.
165. Zhang Y¹, Fang B¹, Emmett MJ¹, Damle M¹, Sun Z², Feng D¹, Armour SM¹, Remsberg JR¹, Jager J¹, Soccio RE¹, Steger DJ¹, Lazar MA³. GENE REGULATION. Discrete functions of nuclear receptor Rev-erb α couple metabolism to the clock. *Science*. 2015;348(6242):1488-92.
166. Fontaine, C., Dubois, G., Duguay, Y., Helledie, T., Vu-Dac, N., Gervois, P., Soncin, F., Mandrup, S., Fruchart, J.C., Fruchart-Najib, J. and Staels, B. The orphan nuclear receptor Rev-Erb α is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ target gene and promotes PPAR γ -induced adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem*. 2003;278, 37672–37680.
167. Yin L, Wu N, Curtin JC, Qatanani M, Szewergold NR, Reid RA, Waitt GM, Parks DJ, Pearce KH, Wilsely GB, Lazar MA. Rev-erb α , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science*. 2007;318: 1786–1789.
168. Harding, H.P. and Lazar, M.A. The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol. Cell Biol*. 1995; 15, 4791–4802.
169. Duez H, Staels B. Rev-erb- α : an integrator of circadian rhythms and metabolism. *J Appl Physiol*. 2009;107(6):1972-80.
170. Vu-Dac, N., Gervois, P., Grotzinger, T., De Vos, P., Schoonjans, K., Fruchart, J.C., Auwerx, J., Mariani, J., Tedgui, A. and Staels, B. Transcriptional regulation of apolipoprotein A-I gene expression by the nuclear receptor ROR α . *J. Biol. Chem*. 1998;272:22401–22404.
171. Raspe, E., Mautino, G., Duval, C., Fontaine, C., Duez, H., Barbier, O., Monte, D., Fruchart, J., Fruchart, J.C. and Staels, B. Transcriptional regulation of human Rev-erb α gene expression by the orphan nuclear receptor retinoic acid-related orphan receptor α . *J. Biol. Chem*. 2002;277, 49275–49281.

172. Duez, H., Mansen, A., Fievet, C., Raspe, E., Fruchart, J.C., Vennstrom, B. and Staels, B. Rev-erba: an orphan nuclear receptor regulating lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis* 2000;149:229–238.
173. Hsu, M.H., Palmer, C.N., Song, W., Griffin, K.J. and Johnson, E.F. A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *J. Biol. Chem.* 1998;273:27988–27997.
174. Barish GD, Downes M, Alaynick WA, Yu RT, Ocampo CB, Bookout AL, Mangelsdorf DJ, Evans RM. A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol.* 2005;19(10):2466-77
175. Wang J, Yin L, Lazar MA. The orphan nuclear receptor Rev-erb α regulates circadian expression of plasminogen activator inhibitor type 1. *J Biol Chem* 2006;281: 33842–33848.
176. Vieira E, Ruana G E, Figueroa A L, Aranda G, Momblan D, Carmona F, Gomis R, Vidal J, Hanzu F A. Altered clock gene expression. In obese visceral adipose tissue is associated with metabolic syndrome. *Plos one.* 2014;3:9 (11): 111678.
177. Goumidi L, Grechez A, Dumont J, Cottel D, Kafatos A, Moreno LA, Molnar D, Moschonis G, Gottrand F, Huybrechts I, Dallongeville J, Amouyel P, Delaunay F, Meirhaeghe A. Impact of REV-ERB α gene polymorphisms on obesity phenotypes in adult and adolescent samples. *Int J Obes (Lond).* 2013;37(5):666-72.
178. Ruano EG, Canivell S, Vieira E. REV-ERB ALPHA Polymorphism Is Associated with Obesity in the Spanish Obese Male Population. *PLoS ONE.* 2014; 9(8):e104065.
179. Garaulet, M. Smith, C.E, Gomez-Abellan, P. Ordovas-Monta, M. Lee, Y. Parnell, L.D. Arnett, K. Ordovás, J.M. REV-ERB-ALPHA circadian gene variant associates with obesity in two independent populations: Mediterranean and North American. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014;58, 821–829.
180. Solt, L.A; Wang, Y.; Banerjee, S; Hughes, T; Kojetin, D. J.; Lundasen, T; Shin, Y.; Liu, J.; Cameron, M. D; Noel, R.; Yoo, S.; Joseph S. Takahashi, Andrew A. Butler⁴, Theodore M. Burris¹, P. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonist. *Nature.* 2012;485, 3..
181. Woldt, E. Sebt, Y. Solt, L.A. Duhem, C. Lancel, S. Eeckhoutte, .Matthijs, J., Hesselink, K.C., Paquet, C., Delhay, S., Shin, Y., Kamenecka, T.M., Schaart, G., Lefebvre, Nevière, R., Burris, T.P., Schrauwen, P., Staels, B., Duez., H. Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med* 2013;19(8): 1039–1046.

3.HIPÓTESES:

A ativação dos receptores nucleares de glicocorticoides periféricos e centrais contribuem para o balanço energético positivo, resultante do aumento do consumo alimentar e/ou diminuição do gasto energético.

A ativação dos receptores nucleares RER-ERB α centrais contribue para o balanço energético negativo, resultante da diminuição do consumo alimentar e/ou aumento do gasto energético.

4.OBJETIVOS:

Avaliar os efeitos da utilização de agonistas específicos para os receptores nucleares de glicocorticoides e para os receptores RER-ERB α , sobre o comportamento alimentar e gasto energético em ratos Wistar.

4.1- Objetivos específicos:

Avaliar os efeitos da administração de agonista dos receptores de glicocorticoides, sob administração periférica e central, sobre;

- O consumo alimentar a cada 4 horas no ciclo escuro,
- Ponto de Saciedade com a Sequencia Comportamental de Saciedade,
- Gasto energético induzido pela atividade locomotora e Parâmetros da atividade locomotora.

Avaliar os efeitos da administração central do agonista dos receptores REV-ERB α sobre,

- A eficiência alimentar,
- A temperatura corporal,
- Tolerância à glicose,
- Tolerância à insulina,
- Gasto energético induzido pela atividade locomotora e Parâmetros da atividade locomotora.

5.MATERIAIS E MÉTODOS:

5.1-Animais:

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar Albinos, aos 60 dias de idade, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição – UFPE. Os animais foram transportados para o biotério de experimentação do Departamento de Nutrição – UFPE, onde passaram por um período de quinze dias de adaptação sob condições padrão de biotério; com temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1$, ciclo claro-escuro invertido de 12/12 horas (escuro: 6:00h às 18:00h / claro: 18:00h às 6:00h) e livre acesso à água e à alimentação padrão de biotério (Valores com macronutrientes na Tabela 1).

Os procedimentos realizados em animais experimentais estiveram de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este projeto foi julgado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (Número do processo: 23076.033268/2013-72 – Anexo 1).

Tabela 1: Relação de macronutrientes da ração padrão de biotério (*Presence rats and mice*)

Macronutrientes	(g/100g)
Proteínas	25,51
Carboidratos	53,59
Lípídeos	4,25
Cinzas	7,6
Humidade	9,05
Kcal/100g	354,65

Análises realizadas pelo Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos- LEAAL
– Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

5.2- Procedimento Cirúrgico – Estereotaxia:

Os animais que compuseram os grupos experimentais tratados com administração intracerebroventricular (i.c.v.) passaram por um procedimento de implantação de cânulas no ventrículo lateral através da cirurgia de estereotaxia. Como procedimento pré-operatório, os

animais foram tratados, nas 24 horas prévias à cirurgia, com o analgésico paracetamol em gotas oferecido na água de beber. Passado esse período, os mesmos foram anestesiados com Ketamina (60mg/Kg pc) e Cloridrato de Xilazina (7,5mg/Kg pc). Após ser verificado a perda do reflexo ciliar, os animais foram posicionados no estereotático (EFF 331 – Estereotaxico I torre, Insight), seguidos de incisão no crânio para o implante unilateral de uma cânula no ventrículo lateral direito (Figura 6). Para tal, foram utilizadas as seguintes coordenadas preestabelecidas seguindo o Atlas Estereotaxico Paxinos – Watson, 1997; coordenada Antero-Posterior = -1, coordenada Látero-Lateral = -2 e coordenada Dorso-Ventral = -5. Uma vez a cânula introduzida, foi fixada com cola cirúrgica e acrílico. Durante o período pós-operatório, os animais foram mantidos com analgésico, paracetamol em gotas oferecidos na água de beber (2mg/100ml) por cinco dias e pentabiótico na dosagem de 10µl/100g (dosagem única). O período de recuperação pós-operatório consistiu entre sete a dez dias onde os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob condições padrão de biotério. De modo a confirmar a posição da cânula no ventrículo lateral, utilizamos o método descrito por Aja e colaboradores 2006. Neste método, os animais ficam privados de água por uma hora. Passado este período de tempo, aplica-se uma injeção i.c.v. de angiotensina na dosagem de 10ng por animal, em um volume de 5µl. A partir da injeção, os animais passam por um período de 30 minutos com acesso *ad libitum* a água. Em seguida, mensura-se os volumes de água ingerido. Nos casos em que o animal consumiu um volume igual ou superior a 5ml, considera-se que a cânula está posicionada no ventrículo lateral [18]. Em amostra aleatória de animais que passaram pelo teste da Angiotensina II, o posicionamento da cânula também foi confirmado através da análise histológica. A administração das drogas e veículos foram realizadas por intermédio de uma seringa de Hamilton com capacidade para 100ul.

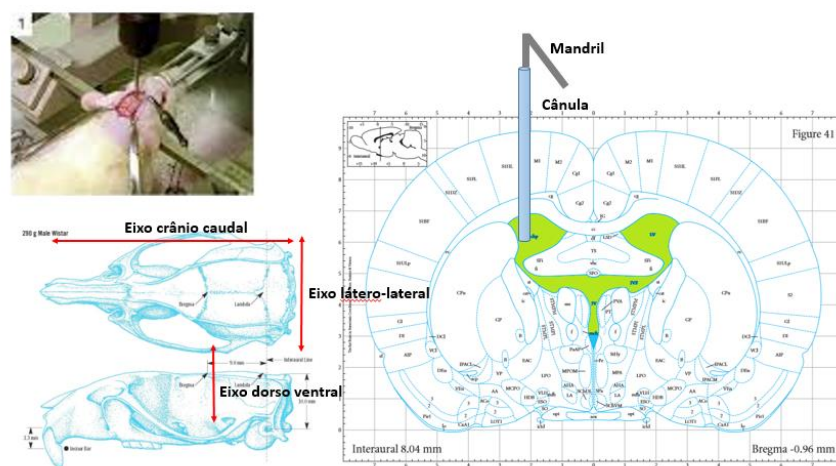


Figura 6: Cirurgia de Estereotaxia. As coordenadas crânio-caudal, látero-lateral e dorso-ventral são seguidas de modo a ser encontrado o ventrículo lateral e ser inserida uma cânula. Imagens retiradas do atlas estereotático Paxinos e Watson.

5.3-Administração da droga:

Para atendermos aos objetivos da nossa primeira hipótese, utilizamos um agonista específico para receptores de glicocorticoides, a Dexametasona Sódio Fosfato (Sigma-Aldrich), que foi administrado por duas vias distintas. Em uma primeira etapa, um grupo de animais foi tratado com injeção intraperitoneal (i.p) e em uma segunda, outro grupo, foi tratado com injeção intracerebroventricular (i.c.v). Para os objetivos da nossa segunda hipótese, utilizamos um agonista específico para o receptor nuclear REV-ERB α , GSK 4112 (Cayman Chemical Company), também em duas vias distintas. Em uma primeira etapa, um grupo de animais foi tratado com injeção i.c.v do agonista, e em uma segunda, outro grupo foi tratado com injeção via i.p. (Figura 7).

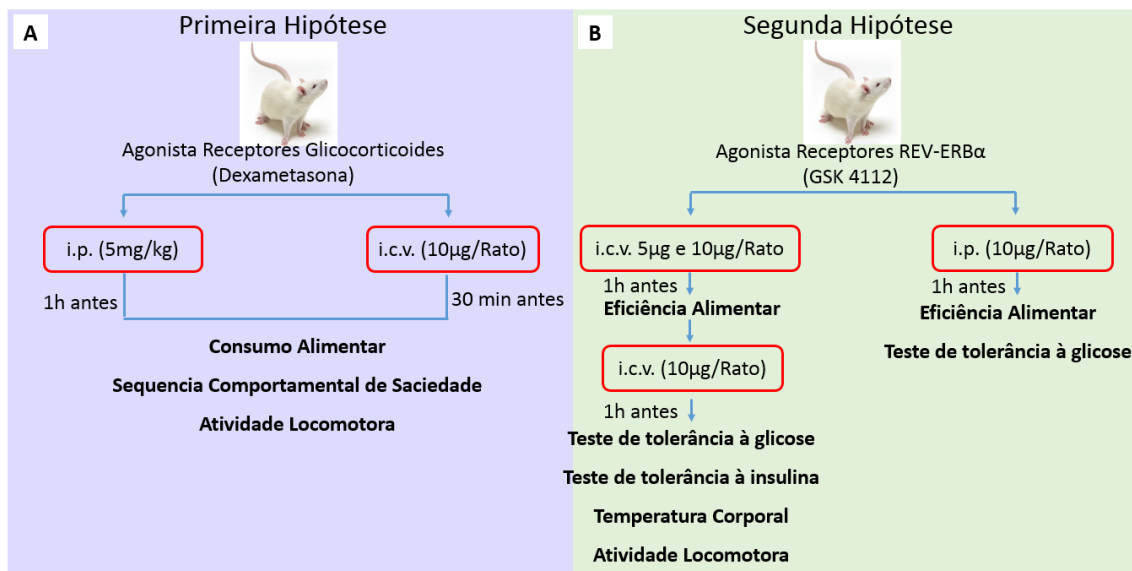


Figura 7: Esquema do desenho experimental da administração dos agonistas. A) A primeira hipótese do projeto os objetivos incluíram o estudo com receptores nucleares de glicocorticoides. Os experimentos foram divididos em duas etapas, a primeira, com administração via i.p. do agonista do receptor e a segunda, a administração i.c.v. B) A segunda hipótese os objetivos incluíram o estudo dos receptores REV-ERB α . Os experimentos também seguiram duas etapas, a primeira com administração do agonista deste receptor via i.c.v., seguida de uma segunda etapa com administração i.p. do mesmo.

5.3.1-Administração do agonista dos receptores nucleares de glicocorticoides - Dexamentazona:

Na administração i.p, a dexametasona foi aplicada numa dose de 5mg/kg do peso corporal. A escolha da dosagem da droga foi baseada na evidência de que ela tem um potencial de afetar o comportamento alimentar [19]. Os animais controles receberam o veículo da droga, que consistiu em solução salina. A administração de ambas, dexamentazona e salina, foi realizada uma hora antes do início dos testes escolhidos para a avaliação do consumo e gasto energético. Os testes comportamentais incluíram consumo alimentar a cada 4 horas no período escuro, Sequencia Comportamental de Saciedade (SCS) e Atividade Locomotora (Campo Aberto) (Figura 7A).

Na administração i.c.v, a dexametasona foi aplicada na dose de 10µg/Rato, em um volume fixo de 5µl (Figura 7A). A escolha dessa dose foi baseada em publicação prévia que demonstrou que a mesma é capaz de ativar células do núcleo arqueado hipotalâmico [20]. O grupo controle recebeu o veículo da droga, o aCSF, cuja constituição se assemelha ao do líquido cefalorraquidiano (Tabela 2). De maneira similar ao grupo tratado, o controle recebeu um volume fixo de 5µl por animal. A administração da dexamentazona e do aCSF foi realizada 30 minutos antes do início dos testes, que também incluem, como comportamentais, o consumo alimentar a cada 4 horas no período escuro, Sequencia Comportamental de Saciedade (SCS) e Atividade Locomotora (Campo Aberto).

5.3.1-Administração do agonista dos receptores nucleares REV-ERB α (GSK 4112):

Na administração i.c.v, o agonista foi aplicado inicialmente nas dosagens de 5µg/rato e 10µg/rato em volume fixo de 5µl. Optamos por essas duas doses pelo fato de não haver, até o presente momento, registros na literatura que tenham administrado este agonista por via i.c.v. Após o primeiro teste, verificamos que a dose com maior potencial de influenciar o comportamento alimentar foi a de 10µg/rato. Sendo assim, nos testes subsequentes, os grupos tratados receberam a dose de 10µg. O grupo controle foi tratado com o veículo da droga, que consistiu em aCSF acrescido com 25% de DMSO, também em um volume fixo de 5µl. O veículo apresenta essa porcentagem de DMSO pelo fato do agonista ser insolúvel em água. A

administração do agonista e veículo nos grupos experimentais ocorreram 1 hora antes do início dos testes, que incluíram; Eficiência Alimentar, Teste de Tolerância a Glicose, Teste de Tolerância a Insulina, Temperatura Retal, Atividade Locomotora (Campo Aberto) e registro contínuo da atividade (Figura 7B).

Embora o GSK 4112 apresente uma farmacocinética com baixa distribuição sistêmica [21], nós também administramos a dose de 10µg por via i.p. O fizemos, levando-se em consideração que a dose do agonista administrada por via i.c.v. poderia ultrapassar a barreira hematoencefálica e se distribuir do encéfalo para a periferia. Havendo essa possibilidade, os efeitos observados por nós após a administração i.c.v. do agonista, poderia não ser por ação exclusivamente central, mas também periférica. O grupo controle recebeu o mesmo volume do veículo, que também consiste em aCSF acrescido de 25% de DMSO. A droga ou veículo foram aplicados 1 hora antes do início do teste de Eficiência Alimentar e de Tolerância à glicose (Figura 7B).

Tabela 2: Composição do líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF)

Composição	Quantidades (mg)
NaCl	866
KCl	22,4
CaCl ₂ .2H ₂ O	20,6
MgCl ₂ .6H ₂ O	16,3
NaHPO ₄ .7H ₂ O	21,4
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2,7

Proporções equivalentes a um volume de 50 ml.

5.4-Testes comportamentais:

5.4.1- Consumo alimentar:

Para testarmos o impacto do tratamento sobre o consumo alimentar, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais para medir o consumo alimentar em intervalos de 4 horas.

Antes da administração i.p. da Dexametasona, o peso corporal foi obtido para o cálculo da dose da droga a ser aplicada. Após as injeções, os ratos tratados com a Dexametasona ou veículo tiveram livre acesso a quantidades de dieta previamente pesados. Os pesos das dietas foram registrados às 6:00, 10:00, 14:00, 18:00 horas. O consumo alimentar foi obtido através da subtração do peso da cota oferecida da dieta pelo peso da cota rejeitada com o auxílio de uma balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000). Os valores foram expressos como consumo alimentar relativo $[\text{Consumo (gramas)}/\text{Peso corporal (gramas)} \times 100]$.

5.4.2- Sequencia Comportamental de Saciedade (SCS):

A técnica de Sequência Comportamental de Saciedade, é um experimento que permite a avaliação do ponto de saciedade. Para a sua realização, os animais tratados com i.p e i.c.v. de dexametasona ou veículo foram mantidos em gaiolas individuais. As 4 horas prévias ao experimento, os animais foram mantidos em jejum. Como mencionado, a depender do tipo de via de administração, a droga foi aplicada em intervalos diferentes. Para a via i.p., as injeções foram aplicadas 1 hora antes do início do teste de SCS e para a via i.c.v., 30 minutos antes. Passados este intervalo, foi ofertada uma cota de peso conhecido da dieta padrão de biotério, e por um período de uma hora, o comportamento dos animais foi analisado quanto aos seguintes parâmetros:

- 1- **Tempo de latência:** intervalo que compreende o tempo, em segundos, prévio ao início da alimentação.
- 2- **Tempo de alimentação:** tempo, em segundos, em que os animais passam se alimentando.
- 3- **Tempo de limpeza:** tempo, em segundos, em que os animais passam no comportamento de limpeza.
- 4- **Tempo de descanso:** tempo, em segundos, em que os animais passam descansando e dormindo.
- 5- **Ponto de saciedade:** ponto no tempo em que há interseção entre as linhas referentes ao tempo de alimentação com a do tempo de descanso.
- 6- **Consumo alimentar relativo:** diferença entre a cota de dieta oferecida e a cota de dieta rejeitada, dividida pelo peso corporal.
- 7- **Taxa de alimentação:** relação entre o consumo alimentar relativo e o tempo de alimentação.

5.4.3-Atividade Locomotora (Campo aberto):

5.4.3.1- *Procedimentos*

Para avaliar as consequências da ativação dos receptores nucleares de glicocorticoides e RER-ERB α sobre o gasto energético e sobre o comportamento ansioso, foi realizado o teste do campo aberto. O gasto energético é dividido em três componentes: a taxa metabólica basal, a produção de calor induzida pela dieta e o gasto energético pela atividade física, que compreende as calorias utilizadas para o movimento [22]. Neste estudo, o teste de atividade locomotora no campo aberto foi realizado para avaliar o gasto energético durante a atividade física seguindo o método descrito por Aragão et al., (2011) e Silva et al., (2016) [23,24]. Neste método, as calorias gastas pelo animal são calculadas a partir de valores de energia cinética obtidos a partir de parâmetros de locomoção (Aragão et al., 2011; Silva et al., 2016). A atividade física já foi usada por outros autores como um indicador de gasto energético em ratos tratados com sibutramina [25]. No atual estudo, os ratos foram colocados no centro de um campo e seu livre movimento foi registrado por um aparelho de monitoramento por 5 minutos, um intervalo de tempo bem aceito entre os autores [25]. Ainda, o teste de campo aberto nos permite analisar o comportamento ansioso, através da avaliação do tempo em que os animais passam nas três áreas do campo [26]. Ratos, apresentam um comportamento denominado de tigmotatismo, que corresponde a andar próximo a paredes. O aumento ou diminuição no tempo de permanência na área central do campo aberto relaciona-se, respectivamente, com diminuição ou aumento dos níveis de ansiedade [27]. Na troca dos animais, o campo foi limpo com solução de álcool a 10%, e o etil vinil acetato (EVA) trocado, para eliminar odores que possam interferir no comportamento do animal seguinte.

5.4.3.2- *Sistema de captação de imagens:*

O campo aberto circular utilizado, é delimitado por paredes de 30 cm de altura, com superfícies internas de cor preta e superfície de EVA, também preta, com objetivo de facilitar a locomoção do animal e proporcionar um maior contraste com este (Figura 8A e B). A

monitoração do movimento do rato ocorreu através de imagens digitais capturados sob luz infravermelha.

No teto da sala, acima do centro do campo aberto, foi fixada uma câmera digital (VTR®6638 – CCTV System) que filma o animal enquanto este se movimenta (Figura 8C). Sua distância do local de fixação até o solo do campo é de 2,40 m. A câmera possui sensor de infravermelho e um LED de iluminação. Apresenta resolução de 420 linhas, velocidade entre 1/60 e 1/100 s, e sua sensibilidade permite registrar imagens com iluminação mínima, até 0,1 lux. A câmera foi acoplada ao computador através de placa de captura.

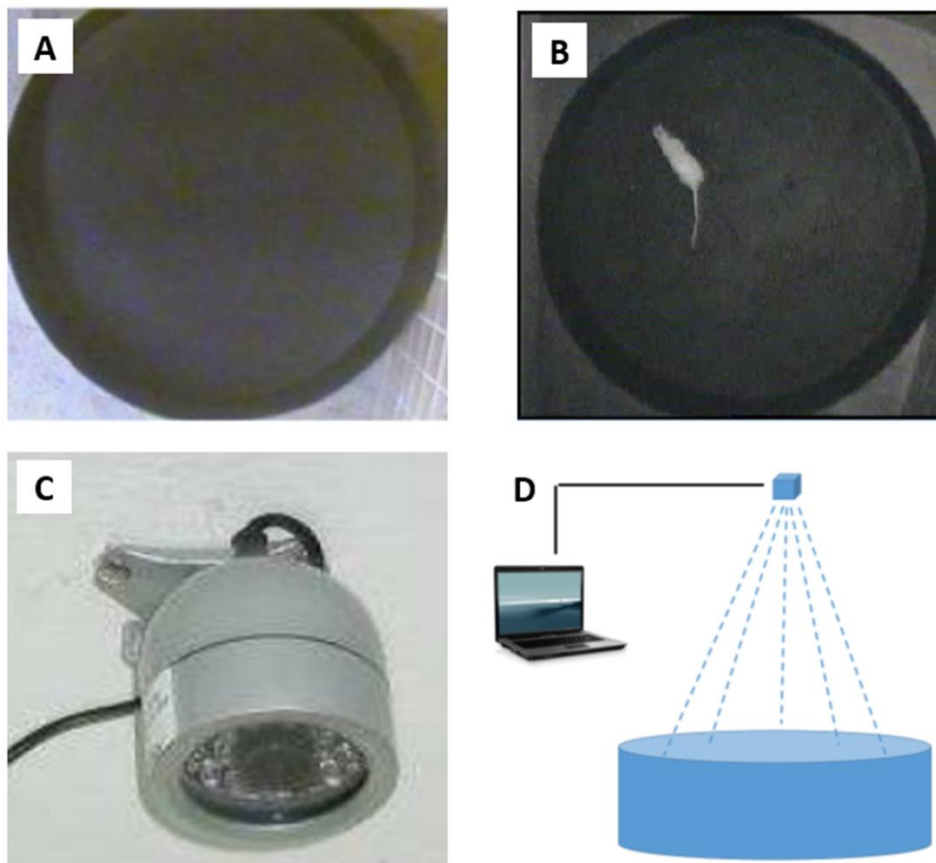


Figura 8: Esquema do método de atividade locomotora. (A) Vista superior do campo aberto em ambiente claro; (B) Imagem do rato no campo; (C) Representação esquemática do sistema de monitoramento no campo aberto; (D) Câmera de captura das imagens dos animais.

Através de um software de captura, o filme é enviado ao computador no qual possui uma taxa de captura de 30 quadros por segundo, tendo o vídeo 240 pixels de altura e 320 pixels de comprimento (Figura 8D). Os vídeos foram salvos no formato AVI, sendo posteriormente divididos em quadros, para análise. No software Paint®, é confeccionado uma máscara com o

objetivo de isolar a imagem do animal no campo dos objetos ao redor. A análise das imagens obtidas a partir de cada vídeo é feita através de uma plataforma de software em MATLAB. Através de uma interface, o avaliador introduz dados para registro do animal e informações que seriam utilizadas para análise dos quadros.

Devido à diferença de cor entre o campo aberto e o animal, o programa utiliza o reconhecimento da intensidade de pixels para estabelecer todos os pontos que formam a imagem do animal, determinando seu ponto médio. Este ponto passa a representar o animal. Dentro do campo aberto, a análise da atividade locomotora é avaliada através das seguintes variáveis:

- **Distância percorrida (m):** corresponde ao somatório de todos os deslocamentos realizado pelo animal;
- **Velocidade média (m/s):** relação do deslocamento total pelo tempo em que o animal permanece em movimento. Fórmula: $\Delta S / \Delta T$, onde ΔS corresponde ao deslocamento total em metros, e ΔT é o tempo total de análise menos o tempo de imobilização em segundos.
- **Potência média (mW):** potência produzida durante o período de deslocamento. Fórmula: $mV^2 / \Delta T$, onde m corresponde a massa do animal em gramas, V é a velocidade média em metros/segundos, e ΔT a análise total do tempo menos o tempo ocioso em segundos.
- **Tempo imóvel (s):** tempo total que o animal permanece imóvel no campo aberto.
- **Número de paradas:** número total de paradas realizadas no campo.
- **Tempo de permanência nas áreas (s):** o campo aberto é dividido, virtualmente, em três áreas (central, intermediária e periférica). Sendo determinado o tempo total de permanência dos animais nessas áreas.
- **Relação tempo de imobilidade/número de paradas (s):** relação entre o tempo total que o animal permanece imóvel no campo aberto e o número total de paradas.
- **Energia gasta:** refere-se ao gasto de energia cinética, cuja fórmula é $m.V^2/2$, onde m é a massa corporal e V a velocidade média. Trata-se da energia que o animal gasta com sua atividade realizada no campo aberto durante os 5 minutos que ele permaneceu no campo.

5.5-Eficiência Alimentar:

A eficiência alimentar é a habilidade do organismo de converter as calorias consumidas em composição corporal. Para calculá-la, dois parâmetros são importantes, o consumo alimentar e o ganho de massa corporal. Para isso, faz-se necessário o registro do peso corporal antes e depois da mensuração do consumo alimentar. No atual estudo, este teste foi planejado para avaliarmos o consumo alimentar, ganho de massa corporal e eficiência alimentar nos grupos tratados com o agonista dos receptores REV-ERB α e veículo. Como mencionado em nossa segunda hipótese, a ativação desses receptores pode reduzir o consumo alimentar e o ganho de massa corporal. Baseado nesta hipótese, optamos por fazer o teste de eficiência alimentar após jejum de 24h, de modo a testarmos o potencial anorético da atividade do receptor. Assim sendo, o teste de Eficiência Alimentar foi realizado da seguinte maneira; uma hora antes do início do período escuro iniciou o jejum dos animais, após 24 horas, a droga ou veículo foi administrada, o peso corporal foi registrado (peso corporal no momento da aplicação da droga) e uma quantidade conhecida de dieta foi ofertada aos ratos. O consumo alimentar foi mensurado nos intervalos de 1, 2, 4 e 24 horas (Figura 9). Neste último intervalo de tempo, o peso corporal também foi mensurado. Com este protocolo, foi possível obter os resultados de consumo alimentar relativo cumulativo nos intervalos de 1, 2, 4 e 24 horas, ganho de massa corporal (subtração do peso corporal 24 horas após a aplicação da droga pelo peso corporal no momento da aplicação da mesma) e eficiência alimentar (ganho de massa corporal dividido pelo consumo alimentar).

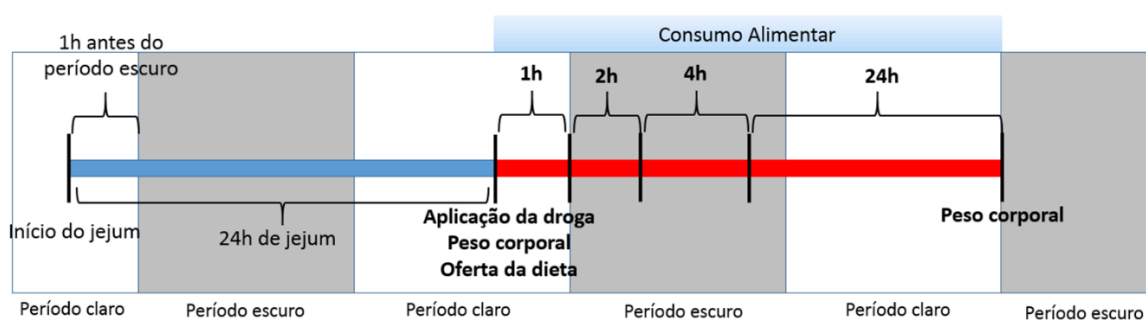


Figura 9: Esquema do teste de Eficiência Alimentar.

5.6-Temperatura Corporal:

A aferição da temperatura corporal dos ratos foi realizada pela via retal com o auxílio de um termômetro digital veterinário de alta precisão (Vet Thermometer) lubrificado com óleo mineral. O protocolo seguido para este teste, foi o mesmo utilizado no teste da Eficiência Alimentar. Optamos por segui-lo de modo a verificarmos a termogênese em resposta ao tratamento sob as mesmas condições em que foram avaliadas a o consumo e a eficiência alimentar. Os animais passaram por um período de 24 horas em jejum, em seguida, administramos a droga e registramos as temperaturas basal e nos subsequentes intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas. Os valores foram expressos em variação de temperatura em relação ao valor basal (Δ Temperatura).

5.7-Teste de Tolerância à Glicose e Teste de Tolerância à Insulina:

Para a realização dos testes de tolerância à glicose e tolerância à insulina, os ratos passaram por um período prévio de jejum de 12 horas. Uma hora antes do início do teste, ou seja, após 11 horas em jejum, os animais pertencentes aos grupos experimentais receberam a aplicação do agonista ou veículo e foi aguardado mais 1 hora para o início do teste, completando assim as 12 horas de jejum. Para o teste de tolerância à glicose, a glicemia basal (no tempo 0) foi obtida em amostra de sangue coletada por um pequeno corte na cauda dos animais. Em seguida, foi administrada por via i.p. solução de glicose à 50% na dose de 1mg/g de peso corporal. Nos subsequentes intervalos de 15, 30, 45, 60 e 120 minutos, a glicemia foi acompanhada. No teste de tolerância à insulina, a glicemia basal também foi coletada seguida de administração por via i.p de solução de insulina na dose de 0,75 mU (34,125ng) /g de peso corporal. A glicemia também foi acompanhada nos intervalos de 15, 30, 45, 60 e 120 minutos após a administração da insulina. As medidas da glicemia foram realizadas com o auxílio de um glicosímetro Accu-check Performa (Roche). Em ambos os testes, a área sob a curva de glicemia foi obtida pelos valores de glicose no sangue nos intervalos analisados usando o método trapezoidal [28].

5.8-Registro contínuo da atividade locomotora:

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais. Acima 15 centímetros da gaiola, um sensor de movimento infravermelho foi posicionado, de modo a captar movimento em qualquer ponto da

gaiola (Figura 10A). O sensor ficava ativo no momento em que o animal iniciava o movimento e ficava inativo quando o animal encerrava o movimento. Assim, o sensor registrou o tempo, em segundos, em que o animal permanecia ativo. O sensor esteve acoplado ao computador por intermédio de uma placa (Figura 10B e C). No computador, um programa fornecia os registros do sensor que correspondia ao tempo em que os animais permaneceram ativos (Figura 10D). Nele, também era possível escolher a amostragem de tempo. No atual estudo, optamos por expressar esses resultados em intervalos de tempo de 60 minutos. Foi contabilizado, então, a quantidade de segundos, dentro dos intervalos de 60 minutos, em que o animal esteve se movimentando. Assim, nossos resultados foram expressos como uma série temporal com intervalos de 60 minutos algumas horas antes e após a administração do agonista ou veículo.

Os experimentos realizados com sensores de movimento foram baseados nos realizados no laboratório de Cronobiologia da UFRN sob orientação do Professor Doutor John Fontenele Araújo [80]. O software foi criado pelo físico Doutor José Borba da Silva Júnior.

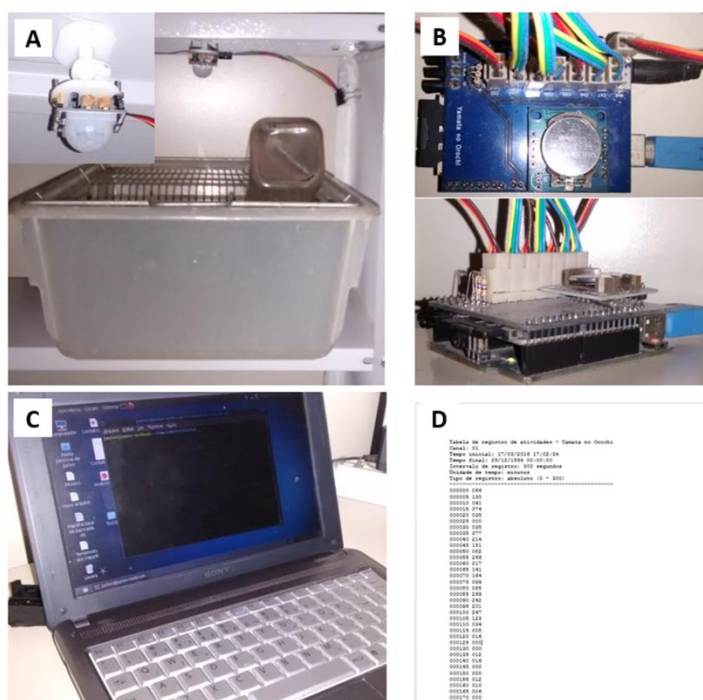


Figura 10: Sistema de registro contínuo da atividade locomotora. (A) o sensor de movimento foi instalado a cerca de 15 cm de altura da gaiola. (B) o sensor foi acoplado ao computador por uma placa. (C) Um programa de computador foi utilizado para extrair o registro em tempo de movimento do rato. (D) Como resultado, foi obtida uma série contínua do tempo em que os animais estiveram ativos.

6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS:

Os dados foram avaliados quanto a distribuição por três testes de Normalidade, o Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino e Shapiro-Wilk. Realizamos o ANOVA two way para as análises de consumo alimentar a cada 4 horas, consumo alimentar cumulativo da eficiência alimentar, temperatura corporal e testes de tolerância à glicose e insulina. O ANOVA one way foi realizado nas análises de eficiência alimentar quando realizado com três grupos (agonista 5µg, 10µg e veículo). O teste t Student não pareado foi realizado nas análises dos parâmetros do campo aberto, registro contínuo da atividade locomotora, da sequência comportamental de saciedade e da área sob a curva nos testes de tolerância à glicose e à insulina. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste de Mann-Whitney. Os valores foram expressos em média $\pm$ EP. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Gráficos e estatísticas foram gerados pelo GraphPad Prism 5.

7-RESULTADOS:

Deste projeto, resultou dois artigos originais:

Artigo 1: **Peripheral and central glucocorticoid signaling contributes to positive energy balance in rats.**

Artigo 2: **The central activation of the nuclear receptors REV-ERB α affects the energetic balance in a manner dependent on the energetic state of the organism.**

7.1- Artigo 1: Peripheral and central glucocorticoid signaling contributes to positive energy balance in rats.

Esse primeiro artigo original resultou do estudo da nossa primeira hipótese; “A ativação dos receptores nucleares de glicocorticoides hipotalâmicos e periféricos contribuem para o balanço energético positivo, resultante do aumento do consumo alimentar e/ou diminuição do gasto energético”. Neste artigo, tivemos como objetivo avaliar o consumo e o gasto energético de ratos tratados com injeções i.p ou i.c.v. do agonista dos receptores de glicocorticoides. Embora hajam relatos na literatura evidenciando a influencia dos glicocorticoides sobre o balanço energético, eles são contraditórios, impossibilitando a chegada de conclusões mais sólidas. Inicialmente, nós administramos por via i.p a dexametasona em ratos wistar, e avaliamos suas repercussões sobre o consumo alimentar, sequencia comportamental de saciedade e atividade locomotora. Observamos que os animais tratados com o agonista apresentaram aumento do consumo alimentar, sem alterações no ponto de saciedade, e redução do gasto energético induzido pela atividade física. Esses resultados são indicativos de que a ação periférica dos glicocorticóides promovem um balanço energético positivo. De modo a analisarmos a ação da dexametasona sobre um dos centros do controle do balanço energético, o hipotálamo, realizamos a administração por via i.c.v. e avaliamos os animais com os mesmos testes anteriores. Similarmente à administração i.p. identificamos aumento do consumo alimentar, retardo do ponto de saciedade e redução do gasto energético. Frente a esses resultados, aceitamos nossa hipótese, de que a ativação periférica e central dos receptores de glicocorticoides, de fato, contribuem para o balanço energético positivo. Esse artigo foi submetido e aceito pela revista *Hormones and Metabolism Research* (carta de aceite AnexoII).

Title: Peripheral and central glucocorticoid signaling contributes to positive energy balance in rats

Short running title: Glucocorticoids and energy balance

T. K. Borba¹

¹Post-Graduation in Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

7.1.2 - Abstract

The obesity epidemic has been the target of several studies to understand its etiology. The pathophysiological processes that take to obesity generally relate to the rupture of energy balance. This imbalance can result from environmental and/or endogenous events. Among the endogenous events, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, which promotes stress response via glucocorticoid activity, is considered a modulator of energy balance. However, it remains controversial whether the increase in plasma levels of glucocorticoids results in a positive or negative energy balance. Furthermore, there are no studies comparing different routes of administration of glucocorticoids in this context. Here, we investigate the effects of intraperitoneal (i.p.) or intracerebroventricular (i.c.v.) administration of a specific agonist for glucocorticoid receptors on food intake and energy expenditure in rats. 60-day old rats were treated with i.p. or i.c.v. dexamethasone. Food intake and satiety were evaluated, as well as locomotor activity in order to determine energy expenditure. Both i.p. and i.c.v. dexamethasone increased food intake and decreased energy expenditure. Moreover, i.c.v. dexamethasone delayed the onset of satiety. Together, these results confirm that central glucocorticoid signaling promotes a positive energy balance and supports the role of the glucocorticoid system as the underlying cause of psychological stress-induced obesity.

Keywords: hypothalamic-pituitary-adrenal axis, dexamethasone, food intake, energy expenditure

7.1.3 - Introduction

Obesity and its related metabolic diseases, such as type 2 diabetes and dyslipidemia, are the most important public health concerns worldwide [1]. The development of obesity is directly associated with a chronic positive energy balance (EB) [2]. EB consists of a metabolic state, accurately regulated day after day, defending equilibrium between food intake (FI) and energy expenditure (EE). When caloric intake overcomes EE, there is a positive EB that, if maintained chronically, leads to obesity [3]. This balance is regulated by integrating peripheral nutritional cues informing the energy status to the brain. Playing a critical role in this regulation is the hypothalamic arcuate nucleus (ARC), a region devoid of a blood-brain barrier [4] that is highly accessible to the peripheral nutrient and hormone signals related to EB. The ARC possesses two populations of primary neurons [4], ones expressing the neuropeptides pro-opiomelanocortin (POMC) and cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) that inhibit FI and increase EE [5], and others expressing the neuropeptide Y (NPY) and agouti-related peptide (AgRP), which in contrast stimulate FI and decrease EE [6,7].

The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is a regulatory hormone release system that controls circulating levels of glucocorticoids (GCs). Under stressful conditions, the HPA axis stimulates corticotropin-releasing hormone (CRH) release in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus [8], leading to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion in the pituitary gland [9], and finally to rapid GC production in the adrenal gland and secretion into the circulation [10]. GC effects are mediated by glucocorticoid receptors (GRs), which are widely distributed throughout the body, including both peripheral and central tissues [11]. Once GCs bind to the cytosolic GRs, this ligand-receptor complex is translocated into the nucleus, where it recognizes and binds to the GC response element [12]. Acting as transcriptional factors, GCs influence the expression of several genes including neuropeptides regulating appetite in the ARC [13].

There is wide evidence that the HPA axis regulates EB. Thus, adrenalectomized animals develop anorexia, an event that can be reversed by supplementation with GCs [14]. This treatment also induced preference for consuming hyperpalatable foods [15]. Moreover, the central administration of GR agonists stimulates the release of orexigenic peptides in the hypothalamus [16]. Clinical observations also support the association between GCs and food consumption, as observed in Cushing's syndrome, which is characterized by hypersecretion of GCs, consequent increase in food consumption and abdominal fat accumulation [17]. However,

others have shown that chronic treatment with i.p. GCs reduces FI and body weight (BW) [18,19].

These data clearly show that GCs are able to influence EB, which is critically regulated in the hypothalamus. To our knowledge, there are no reports in the literature comparing the effects of peripheral and central administration of GCs on EB. Furthermore, most published studies have examined the involvement of GCs only on FI. Thus, the present study was designed to compare the effects of central and peripheral glucocorticoid on EB. In particular, we investigated the effects of i.c.v and i.p. GCs administration on feeding behavior and EE by using the behavioral satiety sequence method and by measuring locomotor activity, respectively.

7.1.4 - Materials and methods

7.1.4.1 - *Animals*

Experiments were performed following the recommendations of the Brazilian Committee for Animal Experimentation (COBEA) after approval from the Ethical Committee on Animal Experiments of the Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco (processing number: 23076.033268/2013-72).

60-day old male Wistar rats from the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco were used. The rats were kept at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 12-h light-dark cycle (light off at 6am. Animals had free access to water and chow (Table 1). All experiments were performed during the dark phase.

7.1.4.2 - *Intracerebroventricular (i.c.v.) surgery*

Rats were anesthetized with intramuscular ketamine (60mg/kg) and xylazine (7.5 mg/kg), and placed on a stereotactic apparatus (EFF 331-I stereotactic tower, Insight) followed by incision of the skull for the unilateral implantation of a cannula in the right lateral ventricle (anteroposterior: -1.0 mm relative to Bregma; lateral: -2.0 mm relative to Bregma; dorsoventral: -5.0 mm below the skull, according to the stereotactic Atlas of Paxinos and Watson). After surgery, animals were kept under postoperative analgesia (paracetamol in drinking water, 2mg/100 mL) for five days and pentabiotics (10µL/100g, single dose). The position of the cannula into the lateral ventricle was confirmed by the Angiotensin-II method, as in Aja et al. [20]. At the end of the experiments, the right position was additionally confirmed by histological analysis.

7.1.4.3 - *Drug administration*

Experimental groups were matched based on their BW (see supplementary Fig. S1). The latter was not followed up after the application of the drug. Animals received single doses of the specific GR agonist, dexamethasone sodium phosphate (Dex; Sigma, USA), via i.p. (5 mg/kg) or i.c.v. (10 µg/rat in 5µL), dissolved in saline or artificial cerebrospinal fluid (aCSF), respectively. Their controls received an equivalent drug-free volume of vehicle. i.p., and i.c.v. injections were performed 1h (5:00 am) and 30 min (5:30am) before the experimental tests, respectively. In order to calculate the drug amount to be injected (i.p.), BW was measured using an electronic scale (Marte, S-4000 model). i.c.v. injections were performed using a Hamilton syringe with a capacity of 100µL. The i.c.v. dose (10 µg) was selected from a previous report showing that this drug amount is able to activate hypothalamic cells in the ARC [21]. The i.p. dose (5 mg/kg) has been shown to affect feeding behavior [22].

7.1.4.4 - Behavioral Assessment

7.1.4.5 - Relative food intake

Rats with 7-days of surgery recovery (i.c.v. treatment) and i.p. rats were housed individually in order to measure FI at intervals of 4 h. For the i.p. administration, BW was measured immediately before the experiment in order to calculate the Dex dose to be injected. After injections (6:00 am), treated and vehicle rats had free access to a pre-weighed amounts of diet during the experiment. Food weight was recorded at 6:00 am, 10:00 am, 2:00 pm and 6:00 pm. FI was calculated by subtracting final food weight from initial food weight for each period of 4 h.

7.1.4.6 - Behavioural Satiety Sequence (BSS)

4-hfasted rats were placed in individual cages. After drug administration, food was offered and behavioral parameters were analyzed for 1 h in periods of 5 min as follows: latency to eat (time in seconds to begin eating after food presentation), meal duration (time in seconds that animals spend feeding), grooming (time in seconds that animals spend in body care movements with the mouth or forelimbs), resting (time in seconds that animals spend sitting or lying in a resting position or sleeping), satiety point (point in time of the intersection between the meal duration and resting), relative food consumption and feeding rate (relative food consumption/meal duration).

7.1.4.7 - Locomotor activity

Total EE is divided into 3 components: basal metabolic rate, diet-induced heat production and physical activity-induced EE (PAEE), which comprises the calories used for movement [23]. Here, we carried out analysis of locomotor activity in order to determine PAEE following the method described by Aragão et al., (2012) and Silva et al., (2016) [24,25]. In this method, the calories expended by the animal are calculated from kinetic energy values obtained from locomotion parameters [24,25]. Physical activity has been already used by other authors as an indicator of EE in sibutramine-treated rats. Thus, rats were placed in the center of a field and their free movement was recorded by a monitoring apparatus for 5 minutes (Open field), a well-accepted interval time among the authors [26]. The analysis of locomotor activity was carried out by measuring the following variables: Distance traveled (m), Rotational displacement (m), Average speed (m/s), Average potency (mW), Time immobile (s), Number of stops, Time immobile/number of stops (s), corresponds to the ratio between the time immobile and the total number of stops. Considering that Dex can induce anxiety and therefore reduce locomotor activity, which can confound an anxiety state with reduced EE, the Length of stay in different areas of the field (central, intermediate, or peripheral area) was evaluated. The length of stay in such areas is usually used to assess anxiety levels [26].

7.1.5 - Data Analysis

Data are presented as means $\pm$ SE. A two-way ANOVA (drug and time as factors) was performed for comparing FI at different times between groups followed by Bonferroni's post hoc test. Unpaired Student's t tests and the Mann-Whitney rank sum tests, when normal distribution was not satisfied, were performed for comparison of behavioral satiety sequence and parameters of locomotor activity among defined groups according to the treatment used (i.p. or i.c.v.). A P value <0.05 was considered significant. Graphs and statistics were generated by GraphPad Prism 5.

7.1.6 - Results

7.1.6.1 - *Relative food intake*

A significant increase in FI was observed in animals treated with i.p. Dex (Fig. 1A and 1B). Compared with the vehicle group, i.p. Dex rats exhibited a relative FI peak 4 h (10:00 am) after injection (Fig. 1A). There was no difference in FI in the remaining timepoints analyzed (Fig. 1A). The 12h cumulative FI was higher in the i.p. Dex group than in the vehicle group (Fig. 1B).

In animals treated with i.c.v. Dex, we also identified an effect on FI (Fig. 1C and 1D). Similarly to the group that received i.p. Dex, animals that received i.c.v. Dex showed an increase in FI at 10:00 am compared to the vehicle group (Fig. 1C). The cumulative FI after 12 h of i.c.v. Dex (Fig. 1D) reproduced what was observed in i.p. Dex rats (Fig. 1B).

7.1.6.2 - *Parameters of feeding behavior*

BSS was performed in order to verify the satiety point after treatment with Dex. Thus, meal duration, grooming and resting were quantified. The administration of i.p. Dex did not alter the satiety point in this group. The satiety point appears at period 6 (vertical line) in both vehicle and treated groups (Fig. 2A and 2B). For the entire test of BSS, there was no difference between treated and vehicle groups with regards to meal duration, grooming and resting, as well as the latency to eat (Table 1). Furthermore, there was no difference in relative FI (Fig. 2C) and feeding rate (Fig. 2D) between Dex and vehicle groups.

In contrast, i.c.v. Dex administration resulted in a delayed satiety point, as shown by the intersection between the lines of meal duration and resting (vertical line) at period 6 for the vehicle group, while it extended beyond period 7 in the i.c.v. Dex group (Fig. 2E and 2F). The latter is due to an increase in meal duration and a decrease in resting duration in the treated group compared to the control group (Table 1). Neither the latency to eat nor grooming were affected by the treatment. However, there was an increase in relative FI in the group treated with Dex compared with the control group (Fig. 2G). The group treated with Dex showed an increase in feeding rate compared to the control group; however, this increase was not significant (Fig. 2H).

7.1.6.3 - *Parameters of locomotor activity*

The locomotor activity test was performed to evaluate the EE of the animals after the central and peripheral administration of Dex. The i.p. Dex group showed lower EE than the control group (Figure 3A). This reduction was associated with a reduction in average potency (Fig. 3B), distance traveled (Fig. 3C) and time immobile (Fig. 3F). Peripheral administration of Dex also increased the rotational displacement (Fig. 3D). The parameters of average speed (Fig. 3E), number of stops (Fig. 3G) and time immobile/number stops (Fig. 3H) did not differ between groups. The analysis of the length of stay in central, intermediate, and peripheral areas of the open field (Table 2), which are markers of anxiety, showed that there was no difference between Dex and control groups.

Central administration of Dex practically reproduced the effects of peripheral Dex, which was evidenced by a reduction in EE, average potency (Fig. 4B) and distance traveled (Fig. 4C), in treated versus controls (Fig. 4A). By this administration route, rotational displacement (Fig. 4D) and immobile time (Fig. 4F) did not reach significant differences; the other parameters, as in i.p. injected rats, were unaltered (Fig. 4E, 4G and 4H). Regarding the length of stay in the central, intermediate and peripheral areas of the open field (Table 2), there were no differences between groups, indicating that i.c.v. Dex administration, like i.p. Dex, does not induce anxiety behavior.

7.1.7 - Discussion

The data obtained here show that both i.c.v. and i.p. Dex groups increased 12-h FI relative to vehicle-injected controls with a peak of FI at 4 h after injections. Our findings are consistent with those in the literature, which show that GCs are able to increase FI and BW [16, 27]. Thus, in rats, under physiological conditions, the peak of FI that occurs right after the light off period is preceded by a peak of plasma GCs [28]. It has been shown that 3-day i.c.v. dexamethasone infusion into the lateral ventricle leads to a sustained increase in FI and BW, which may be explained by an increased expression of the orexigenic neuropeptide NPY in the ARC and the promotion of a state of leptin resistance as revealed by an increase in plasma leptin [16]. In this study, the same i.p. dose of dexamethasone failed to increase FI, excluding a peripheral action of i.c.v. administrated dexamethasone and indicating that the increase in FI showed by i.c.v. dexamethasone is an exclusive central effect. The lack of an effect of i.p. Dex observed in the above mentioned study contrasts with the FI induction found with i.p. Dex in our study. Such difference may be attributed to dosage; indeed, it is not difficult to imagine that a low concentration (5 µg) of dexamethasone administrated i.p. is not enough (unlike our study, where we administered 5 mg/kg) to modify the homeostasis of the hypothalamic neuropeptides (NPY, AgRP) for increasing FI. Thus, we propose that the GCs-induced FI observed in our study also depends on central action of dexamethasone. Supporting this idea, it has been shown that both acute i.c.v. (10µg) and peripheral (5 mg/kg) GCs administration is able to activate hypothalamic cells [21]. Moreover, the regulation of NPY expression by GCs and the dependence of NPY on GCs to increase FI are well established [16,29]. For further understanding the eating behavior in our experimental setup we studied the microstructure of feeding by BSS. The animals treated with i.p. Dex showed no effects on FI during the test (1h). Both treated and matched control groups exhibited the satiety point at period 6 (30 min), after food was made available. However, i.c.v. Dex delayed around 8 min (~27%) the satiety point relative to their vehicle group. This

delay was favored by an increase in meal duration and a decrease in resting as well as by the increase of relative FI. This difference in the satiety point observed between the groups treated with Dex may be due to the route of administration and therefore their velocity to reach the hypothalamus in concentrations sufficient to induce an effect. Indeed, i.p. Dex did not increase FI at 1 h, but it achieved this at 4 h, suggesting that the minimal GC concentration in the hypothalamus to observe an effect is time-dependent. This hypothesis is supported by data in the literature that show an increase of hypothalamic cFos expression, a marker of neuronal activity, 2 h after peripheral dexamethasone administration [21]. FI is critically regulated in the hypothalamus [3] and it is known that the satiety point is reached when the levels of the orexigenic neuropeptides NPY and AgRP are lower than the levels of the anorexigenic neuropeptides POMC and CART [6]. Thus, the increase in FI and delayed satiety point observed in this study can be explained by an induction of GCs-dependent NPY/AgRP expression. Supporting this idea, studies in the literature show that i.c.v. administration of agonists for GRs promotes an increase in the expression of the NPY and AgRP genes [30]. Moreover, Briski et al., (1997) showed that GCs administration in the lateral ventricle (as in this study) induces cFos reactivity in the ARC, demonstrating the capacity of GCs to activate cells in this hypothalamic nucleus where NPY and AgRP are synthesized. Although we did not measure the levels of hypothalamic peptides involved in the control of energy balance, the data cited above provide solid evidence to suggest that the delay and associated increase in FI induced by GCs could involve up-regulation of orexigenic neuropeptides.

In order to establish whether GCs regulate EE, which along with FI determine the energy balance, we performed EE analysis by measuring physical activity-induced EE in a locomotor activity test. We observed that animals treated with i.p. Dex showed a reduction in EE associated with a reduction of potency and distance traveled, as well as increased immobile time. Skeletal muscle corresponds to 40-50% of the body mass tissue and is an important player in energy metabolism, and therefore in EE [31]. Circulating dexamethasone may bind to GRs widely distributed among peripheral tissues, including the skeletal muscle [32]. In this tissue, stimulation of GRs decreases glucose uptake by inhibiting insulin-stimulated recruitment of the glucose transporter GLUT4 to the cell surface [33;34]. In addition, activation of GRs also promotes changes in skeletal muscle protein metabolism. Indeed, it has been demonstrated that dexamethasone increases the expression of MuRF1, an important E3 ubiquitin ligase implicated in protein degradation, present in skeletal muscle [35]. The resulting amino acids are transported into the liver where they serve as substrates for hepatic gluconeogenesis. Thus, we

suggest that the action of GCs in skeletal muscle promotes a state of reduced EE, explaining the decrease in distance traveled, average potency, and increased immobile time. The decrease in EE was most likely the result of GCs action on peripheral receptors, since at the same time interval of drug administration, the animals showed no change in feeding behavior, which is regulated centrally. Central administration of Dex also decreased EE. This central effect probably involves changes in the balance of the hypothalamic peptides such as NPY and AgRP, influencing peripheral tissues. This hypothesis is supported by data in the literature showing an influence of AgRP cells on EE and locomotor activity [36]. The NPY pathway was also directly associated with decreased locomotor activity and BW gain [37]. Thus, the decreased EE observed in i.c.v. treated rats with Dex might have an effect on increased orexigenic peptide expression.

It is known that dexamethasone can induce behaviors such as anxiety and depression, reducing locomotor activity that could introduce a confounding factor in interpreting EE. Regarding the anxious behavior, Dex is an agonist of a receptor whose endogenous ligand is considered the stress hormone. The parameter Length of stay in the central or intermediate or peripheral area allows evaluating the levels of anxiety in rats [38]. The animals exhibit a behavior called thigmotaxis, which corresponds to walking near walls [39]. The increase or decrease in length of stay in the central area of open field indicates the reduction or increase in anxiety levels, respectively [38]. Here, we observed that animals treated with both central and peripheral Dex showed no differences in length of stay in the three areas of the open field. It suggests that the reduction in EE seen in our animals treated with Dex did not result from increased anxiety, which leads to lower activity in the open field. Furthermore, the anxious behavior is related to the fight or flight response [40]. This response is linked to a non-genomic mechanism of GRs, which requires rapid and transient responses that do not rely on gene expression [40]. Ferreira and colleagues (2000) found that 4 h after i.p. administration of Dex, did not reduce the anxiolytic action of ethanol. However, 15 minutes after i.p. administration of Dex decreased the anxiolytic action of ethanol in rats [41]. In our study, the interval between the application of the drug and the onset of experimental tests was enough for these fast responses to have been lost. Regarding the depressive behavior, Dex exposure must be chronic in order to observe a such phenotype [42]. In line with this, Pan and colleagues demonstrated a relationship between chronic hyperactivity of the HPA axis and recurrent affective disorders [43]. However, in our study we focused on acute administration of Dex. Moreover, the presence

of a malaise can be excluded since compared to vehicle rats, Dex treated rats exhibit an identical response to eat when food was presented during the BSS test.

The data presented here show that GCs increase FI and decrease physical activity-induced EE. These changes promote a positive energy balance, which leads to BW gain. Although in this study we did not measure BW change, due to the short time of evaluation (12h), it is known that GCs promote BW gain [16]. In this study we determined only a component of EE (induced by locomotor activity), however we do not exclude an effect of GCs on sympathetic signaling-induced thermogenesis. In fact, i.c.v. GCs decreased the expression of the thermogenic proteins uncoupling protein 1 and 3 (UCP1 and UCP3) in brown adipose tissue [16]. Further studies using indirect calorimetry are necessary to determine whether thermogenesis is also down-regulated, which might contribute to the positive energy balance observed under GCs treatment.

In summary, we conclude that the activation of GRs promotes FI and decreases EE contributing to a positive EB. Thus, the stimulation of GRs under stressful conditions might be involved in a complex series of mechanisms related to the etiology of obesity.

7.1.8 - References

1. James WP. The epidemiology of obesity. *Ciba Found Symp* 1996; 201: 1–11.
2. Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, Coner R.D. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*. 1994; 371:799–802.
3. Cota D, Proulx K, Seeley RJ. The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology*. 2007; 132(6):2158-68.
4. Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J ObesRelatMetabDisord*. 2001; 5:S637.
5. Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhaj MJ, Saper CB, Elmquist JK. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*. 1998; 21 (6):1375-85. 23.
6. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti generelated protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl AcadSci U S A*. 1998; 95(25):15043-8.
7. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995; 269(5223):543-6.
8. Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 1982; 299: 355-357.
9. Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: Comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* 1995; 15: 6340-6350
10. Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N. Regulation of ACTH secretion: Variations on a theme of B. *Recent ProgHorm Res* 1987; 43: 113-173.
11. Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 1985; 117: 2505-2511.
12. Nishi M, Kawata M. Brain corticosteroid receptor dynamics and traf- ficking: Implications from live cell imaging. *Neuroscientist* 2006; 12: 119- 133.
13. Sominsky L, Spencer SJ. Eating behavior and stress: a pathway to obesity. *Front Psychol*. 2014; 5:434.
14. Santana P, Akana SF, Hanson ES, Strack AM, Sebastian RJ, Dallman MF. Aldosterone and dexamethasone both stimulate energy acquisition whereas only the glucocorticoid alters energy storage. *Endocrinology*. 1995;136(5):2214-22.

15. Devenport L, Knehans A, Thomas T, Sundstrom A. Macronutrient intake and utilization by rats: interactions with type I adrenocorticoid receptor stimulation. *Am J Physiol.* 1991;260(1 Pt 2):R73-81.
16. Zakrzewska KE, Cusin I, Stricker-Krongrad A, Boss O, Ricquier D, Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F. Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes.* 1999;48(2):365-7
17. Shibli-Rahhal, M. Van Beek, J.A. Shlechte, Cushing's syndrome, *Clin. Dermatol.* 24(4) 2006. 260-265.
18. Liu XY, Shi JH, DU WH, Fan YP, Hu XL, Zhang CC, Xu HB, Miao YJ, Zhou HY, Xiang P, Chen FL. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide. *Exp Ther Med* 2011; 2(5):977-984.
19. Jahng JW, Kim NY, Ryu V, Yoo SB, Kim BT, Kang DW, Lee JH. Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats. *Eur J Pharmacol.* 2008; 26;581(1-2):64-70
20. Aja S, Bi S, Knipp SB, McFadden JM, Ronnett GV, Kuhajda FP, Moran TH. Intracerebroventricular C75 decreases meal frequency and reduces AgRP gene expression in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 291(1):148-54
21. Briski KP, DiPasquale BM, Gillen E. Induction of immediate-early gene expression in preoptic and hypothalamic neurons by the glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone. *Brain Res.* 1997;768(1-2):185-96.
22. Casarotto PC, Andreatini R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2007 Nov; 17(11):735-42.
23. Westerterp KR. Physical activity and physical activity induced energy expenditure in humans: measurement, determinants and effects. *Front Physiol.* 2013;26;4-90.
24. Aragão R da S, Rodrigues MA, de Barros KM, Silva SR, Toscano AE, de Souza RE, Manhães-de-Castro R. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents a reproducibility study. *J Neurosci Methods.* 2011; 195(2):216-21.
25. Silva KO, Pereira Sda C, Portovedo M, Milanski M, Galindo LC, Guzmán-Quevedo O, Manhães-de-Castro R, Toscano AE. Effects of maternal low-protein diet on parameters of locomotor activity in a rat model of cerebral palsy. *Int J Dev Neurosci.* 2016;52:38 -45.
26. Golozoubova V, Strauss F, Malmlof K. Locomotion is the major determinant of sibutramine-induced increased energy expenditure. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006 ;83(4) :517-27
27. Tempel, DL, Leibowitz, SF. Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism, *J. Neuroendocrinol.* 1994; 479–501

28. Sujino M, Furukawa K, Koinuma S, Fujioka A, Nagano M, Iigo M, Shigeyoshi Y. Differential entrainment of peripheral clocks in the rat by glucocorticoid and feeding. *Endocrinology*. 2012; 153(5):2277-86.
29. Sainbury A, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Adrenalectomy prevents the obesity syndrome produced by chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats. *Diabetes*. 1997;46(2):209-14.
30. Lee B, Kim SG, Kim J, Choi KY, Lee S, Lee SK, Lee JW. Brain-specific homeobox factor as a target selector for glucocorticoid receptor in energy balance. *Mol Cell Biol*. 2013; 33(14):2650-8.
31. Sandri M. Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Lett*. 2010; 584(7):1411-6.
32. Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 1985; 117: 2505-2511.
33. Vegiopoulos A1, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 275(1-2):43-61.
34. Weinstein SP1, Wilson CM, Pritsker A, Cushman SW. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metabolism*. 1998; 47(1):3-6.
35. Waddell DS1, Baehr LM, van den Brandt J, Johnsen SA, Reichardt HM, Furlow JD, Bodine SC. The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 295(4):E785-97.
36. Huang H, Lee SH, Ye C, Lima IS, Oh BC, Lowell BB, Zabolotny JM, Kim YB. ROCK1 in AgRP neurons regulates energy expenditure and locomotor activity in male mice. *Endocrinology*. 2013; 154(10):3660-70.
37. Lian J, De Santis M, He M, Deng C. Risperidone-induced weight gain and reduced locomotor activity in juvenile female rats: The role of histaminergic and NPY pathways. *Pharmacol Res*. 2015; 95-96:20-6.
38. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003; 463(1-3):3-33.
39. Kopp, C., Misslin, R., Vogel, E., Rettori, M.C., Delagrangé, P., Guardiola Lemaître, B. Effects of day-length variations on emotional responses toward unfamiliarity in Swiss mice. *Behav. Proc* 1997; 41:151 – 157.
40. Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(9):518-30.
41. Ferreira VM, Takahashi RN, Morato GS. Dexamethasone reverses the ethanol-induced anxiolytic effect in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;66(3):585-90.
42. Bhatt S, Shukla P, Raval J, Goswami S. Role of Aspirin and Dexamethasone against Experimentally Induced Depression in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016;119(1):10-8.

43. Pan Y, Lin W, Wang W, Qi X, Wang D, Tang M. The effects of central pro-and anti-inflammatory immune challenges on depressive-like behavior induced by chronic forced swim stress in rats. *Behav Brain Res.* 2013;247:232-40.

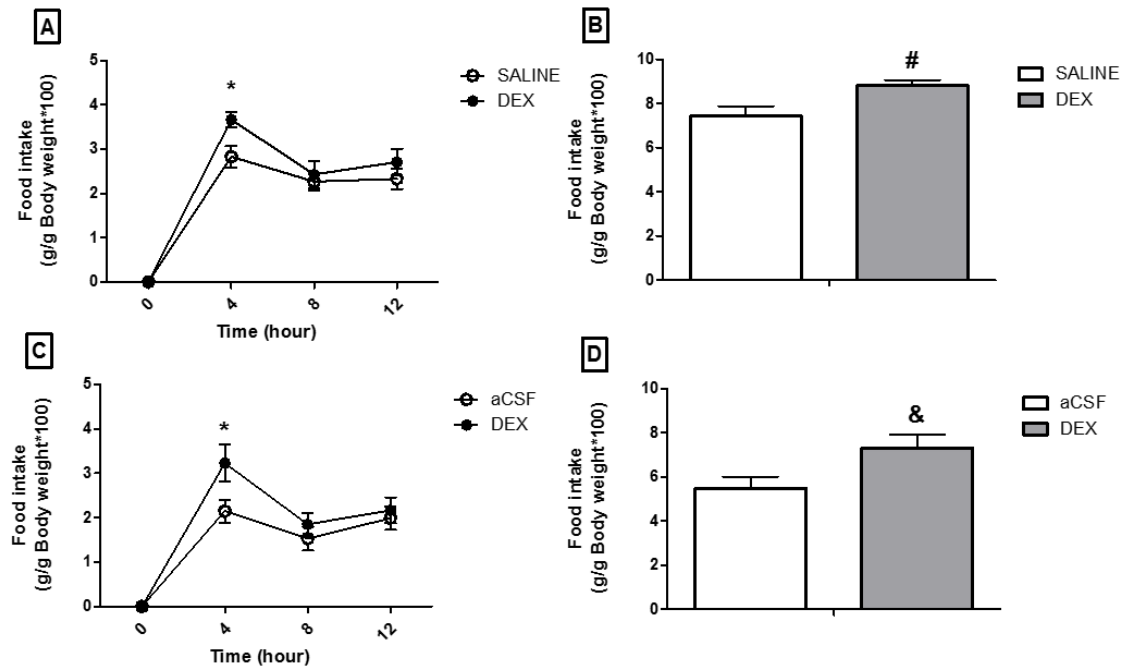


Figure 1: Effects of Dex administration on FI in rats aged 60 days. A and B, i.p. administration of Dex (5mg/kg, N=10) and saline (0.9% sodium chloride solution, N=10) as vehicle (control group), one hour before the dark cycle. C and D, i.c.v. administration of Dex (10mg, N=10) and aCSF (5ul, N=10) as vehicle (control group), 30 minutes before the beginning of the dark cycle. FI was measured at intervals of 4 hours in the dark cycle (A and C) and after 12 hours (B and D). All data represent mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, # $p < 0.05$ Unpaired Student's t test, & $p < 0.05$ Mann Whitney test.

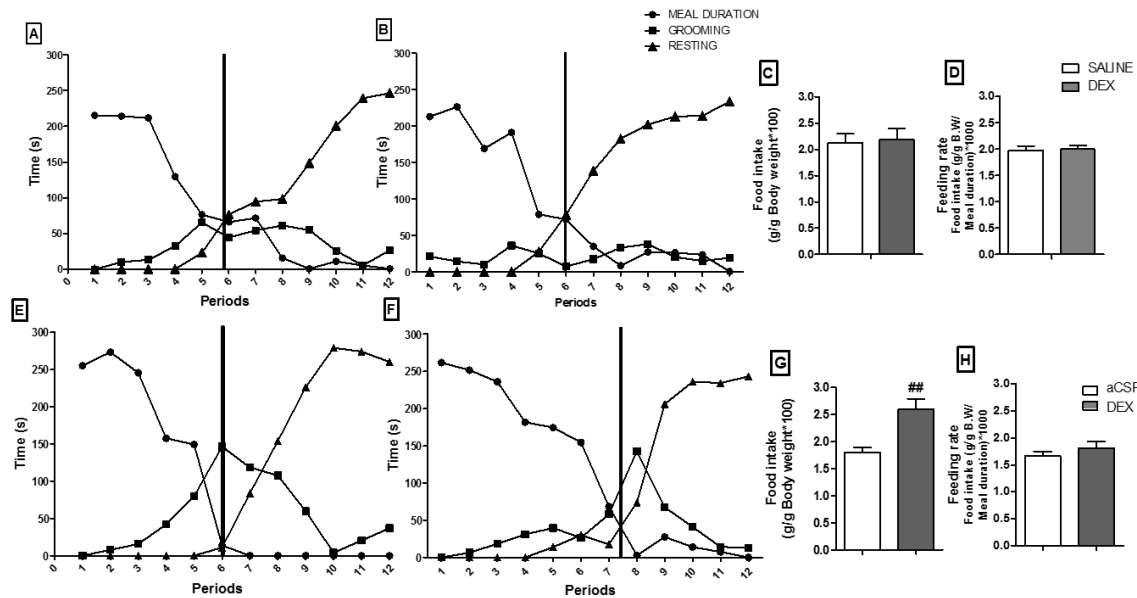


Figure 2: Effects of Dex administration on satiety in rats aged 60 days after 4 hours fasting. A, B, C and D, i.p. administration of Dex (5mg/kg, N=10) and saline (0.9% sodium chloride solution, N=10) as vehicle (control group). Standard laboratory chow was offered one hour after injection. E, F, G and H, i.c.v. administration of Dex (10mg, N=10) and aCSF (5ul, N=10) as vehicle (control group). The behaviors of feeding, grooming and resting were registered for 60 minutes. The vertical line represents the satiety point, A and B, mean of the satiety point in animals treated with i.p. injection of saline and Dex, respectively. E and F, mean of the satiety point in animals treated with i.c.v. injection of aCSF and Dex, respectively. C and G, mean $\pm$ SEM of the relative food consumption and D and H, mean $\pm$ SEM of the feeding rate measured one hour after beginning the test. ## $p < 0.01$ Unpaired Student's t test.

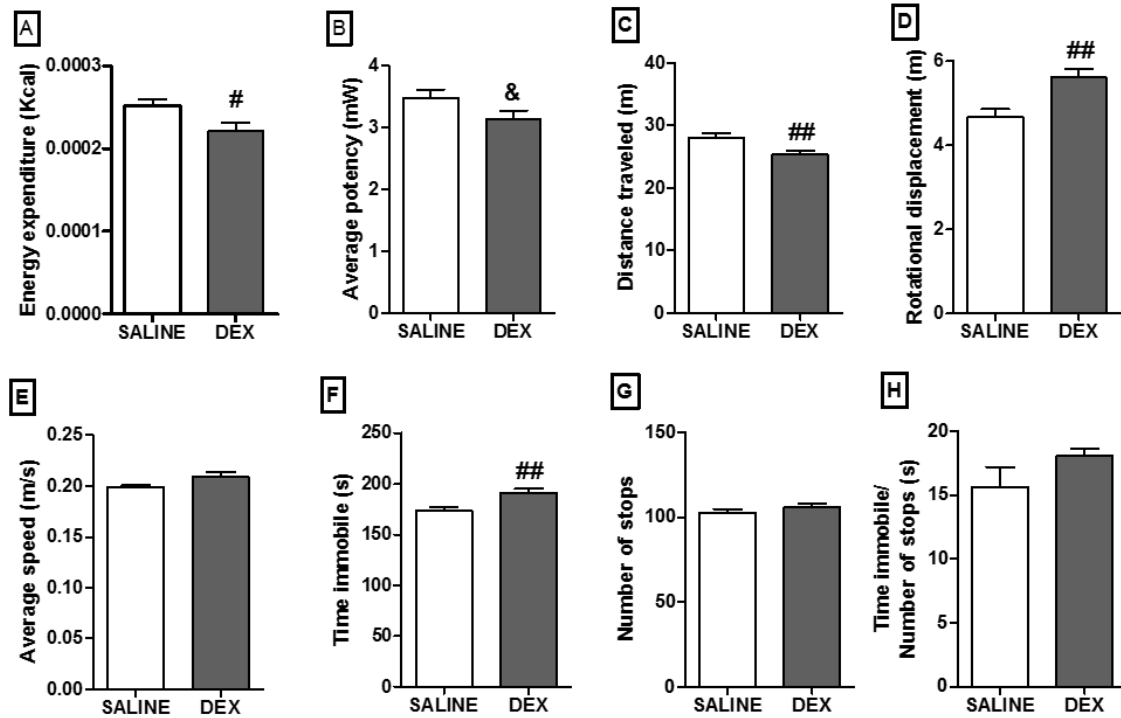


Figure 3: Parameters of locomotor activity in rats aged 60 days treated with i.p. injection of Dex (5mg/kg, N=10) or saline (0.9% sodium chloride solution, N=10) as vehicle (control group). The i.p. injection was applied one hour before the start of the test. The animals were placed in the open field and were evaluated over a period of 5 minutes. A, EE (kcal). B, Average potency (mW). C, Distance traveled (m). D, Rotational displacement (m). E, Average speed (m/s). F, time immobile (s). G, number of stops. H, time immobile/number of stops (s). Data represent mean $\pm$ SEM, # $P < 0.05$, ## $p < 0.01$ Unpaired Student's t test. Data represent median and interquartile range, & $p < 0.05$. Mann Whitney test.

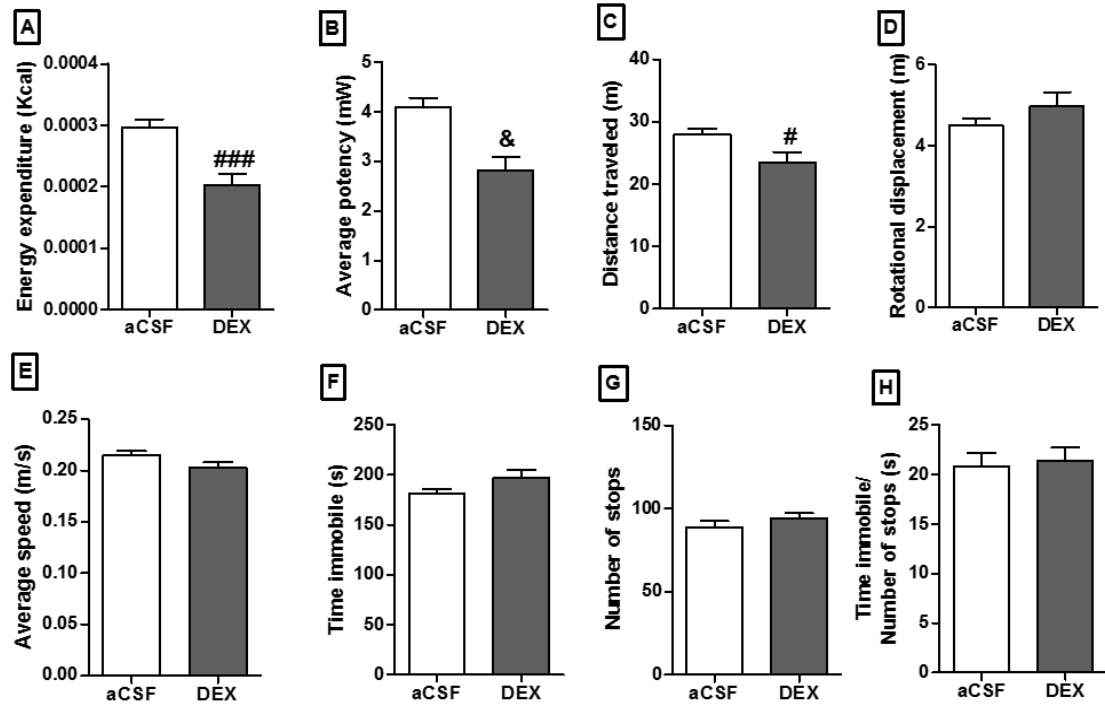


Figure 4: Parameters of locomotor activity in rats aged 60 days treated with i.c.v. injection of Dex (10mg, N=10) or drug vehicle, aCSF (5ul, N=10). The i.c.v. injection was applied 30 minutes before beginning the test. The animals were placed in the open field and were evaluated over a period of 5 minutes. A, Energy expenditure (kcal). B, Average potency (mW). C, Distance traveled (m). D, Rotational displacement (m). E, Average speed (m/s). F, time immobile (s). G, number of stops. H, time immobile/number of stops (s). Data represent mean $\pm$ SEM, # $P < 0.05$, ### $p < 0.01$ Unpaired Student's t test. Data represent median and interquartile range, & $p < 0.05$. Mann Whitney test.

Table 1: Relation of macronutrients of the standard chow animal feed (Presence rats and mice)

Macronutrients	(g/100g)
Proteins	25,51
Carbohydrates	53,59
Lipids	4,25
Ashes	7,6
Humidity	9,05
Kcal/100g	354,65

Analyses carried out at the Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos- LEAAL - Federal University of Pernambuco - UFPE

Table 2: Effects of i.p. and i.c.v. injection of dexamethasone on the evaluated parameters during the Behavioral Sequence of Satiety (BSS)

	Saline (i.p)	Dexametasone (i.p)	p	aCSF (i.c.v)	Dexametasone (i.c.v)	p
Latency (s)	59,40±28,60	37,80±5,40	0,467	42,10±6,019	29,80±4,541	0,1202
Meal duration (s)	1114±121,0	1176±134,0	0,736	1094±32,65	1380±122,9 #	0,0375
Grooming (s)	426,4±60,12	281±56,96	0,096	639±114,5	458,6±54,54	0,1720
Resting (s)	1304±144,2	1415±204,7	0,662	1281±116,2	458,6±54.54 ###	<0,001

Data are expressed as mean ± SEM. # p <0.05, ### p <0.001. Student t test.

Table 3: Effects of i.p and i.c.v. injection of dexamethasone on the length of stay in the area of open field during locomotor activity.

	Saline (i.p)	Dexametasone (i.p)	p	aCSF (i.c.v)	Dexametasone (i.c.v)	p
Time in area 1 (s)	11,39 ± 1,286	14,27 ± 2,649	0,3411	8,896 ± 2,437	9,920 ± 2,102	0,6489
Time in area 2 (s)	38,66 ± 6,114	39,42 ± 6,841	0,9342	36,99 ± 6,991	27,46 ± 5,062	0,2838
Time in area 3 (s)	250,1 ± 6,996	246,5 ± 9,024	0,7530	254,3 ± 9,376	262,8 ± 6,036	0,6499

Data are expressed as mean ± SEM. Student t test, Mann Whitney

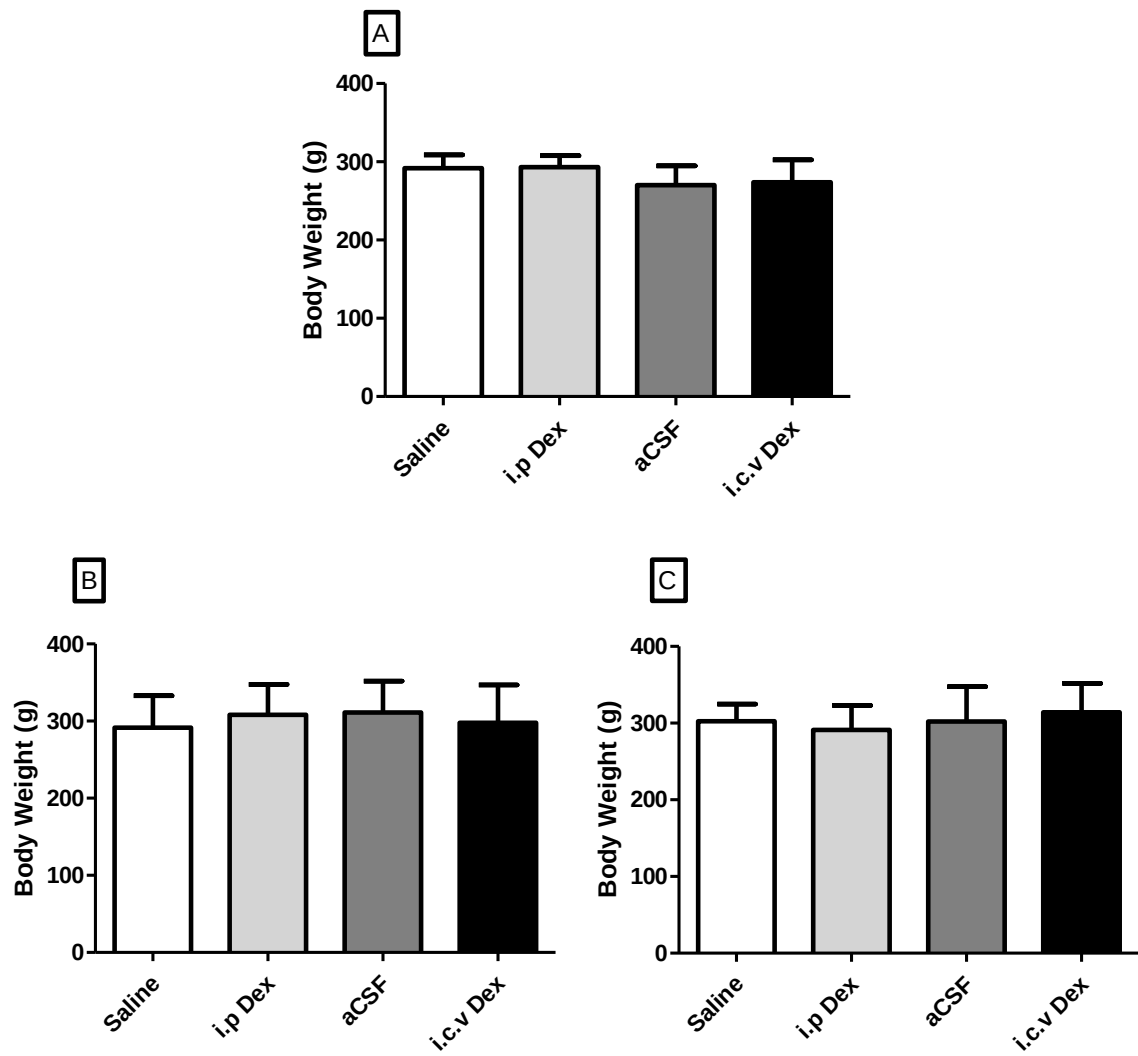


Figure S1: Body mass. Body mass was measured before the behavioral tests of (A) food intake; (B) Behavioral Satiety Sequence, and (C) locomotor activity in order to distribute the experimental groups. Saline (N = 10), i.p. Dex (N = 10), aCSF (N = 10) and i.c.v. Dex (N = 10). Data are expressed as means $\pm$ SD, one-way ANOVA, $p > 0.05$, Bonferroni post-test.

7.2- Artigo 2: The central activation of the nuclear receptors REV-ERB α affects the energetic balance in a manner dependent on the energetic state of the organism.

O segundo artigo original, resultou do estudo da nossa hipótese; “A ativação dos receptores nucleares RER-ERB α centrais contribui para o balanço energético negativo, resultante da diminuição do consumo alimentar e/ou aumento do gasto energético. Neste artigo, tivemos como objetivo avaliar os efeitos da administração central do agonista dos receptores REV-ERB α sobre o balanço energético. Embora alguns estudos epidemiológicos apontem relação entre deficiência desses receptores e desenvolvimento de obesidade e desordens metabólicas, pouquíssimas são as publicações que objetivaram avaliar a ação do REV-ERB α sobre o controle do balanço energético. O atual estudo, é o primeiro a observar os efeitos da ativação central do REV-ERB α sobre parâmetros do balanço e metabolismo energético. Observamos que os ratos tratados com o agonista apresentaram aumento do consumo e da eficiência alimentar, bem como redução da tolerância à glicose, após jejum. Esses resultados sugerem a contribuição do REV-ERB α central para o balanço energético positivo, caracterizado pelo aumento do consumo alimentar e redução do gasto energético. Tais evidências contrastam com as obtidas em ratos tratados com administração periférica do agonista para este mesmo receptor, sugerindo que a ação do REV-ERB α possa ser tecido-dependente. Entretanto, sob alimentação *ad libitum*, os ratos tratados com o agonista apresentaram aumento da atividade locomotora e do gasto de energia induzido por ela, e não apresentaram alterações no consumo alimentar, com apenas tendência a redução na eficiência alimentar. Estes resultados, podem sugerir que o REV-ERB α também possa contribuir para o balanço energético negativo. Diante dessas evidências, conclui-se que as relações entre os receptores REV-ERB α centrais com o balanço energético envolvem mecanismos complexos e sugerem que esses receptores possam agir de maneira bimodal sobre o controle do balanço energético, dependente do estado energético do organismo. Este artigo será submetido a revista *International Journal of Obesity*.

Title: The central activation of the nuclear receptors REV-ERB α affects the energetic balance in a manner dependent on the energetic state of the organism.

T. K. Borba¹,

¹Post-Graduation in Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Health Sciences Center,
Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

7.2.1 - Abstract

Alteration of circadian rhythms by modern lifestyle has been associated with obesity and obesity-linked diseases including type 2 diabetes. Obesity results from an alteration of energy balance, which is coupled to biological rhythms that depend on the clock system. Rev-erb α , a transcriptional repressor associated with this system, has been shown to regulate energy balance. Peripheral administration of Rev-erb α agonists lead to body weight and fat mass reduction. However, the ability of Rev-erb α to centrally regulate energy balance has not been demonstrated. Thus, the aim of this study was to elucidate whether central activation of Rev-erb α modulates body weight and food intake as well as glucose tolerance. 60 day old fasted Wistar rats were injected intracerebroventricularly with the Rev-erb α agonist GSK4112 and the acute effects on food intake, body weight gain, feed efficiency and glucose tolerance were evaluated. Surprisingly, central activation of Rev-erb α shows opposing effects to its peripheral administration. Indeed, Rev-erb α led to a significant 24-h body weight gain and feed efficiency, and impaired glucose tolerance. Moreover, Rev-erb α promoted an increase in food intake at 4 and 24-h after injection. However, these effects were lost under free-fed conditions. Taking into account these results, we conclude that central Rev-erb α signaling regulates energy balance in an energetic state-dependent manner. Since Rev-erb α is a key regulator of circadian cycles, alteration of its activity might be the underlying cause of obesity and diabetes associated with circadian rhythm alterations.

Keywords: energetic balance, REV-ERB α agonist, food intake, energy expenditure

7.2.2 - Introduction:

It is estimated that the incidence of overweight and obesity in the world in 2030 reaches 57.8% in the adult population [1]. Thus, obesity and metabolic comorbidities associated with this are public health problems with serious socio-economic impact. The complex etiology of obesity involves the control of energy balance (EB) and circadian rhythm system [2]. EB control involves peripheral and central tissues. Among the central tissues, we highlight the hypothalamus that integrates peripheral information about the nutritional status of the organism [3]. In response to nutritional status, there is a balance between peptides in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC). These peptides are anorexigenic, pro-opiomelanocortin (POMC) and cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) that inhibit Food Intake (FI) and increase Energy Expenditure (EE) [4], and the orexigenic, neuropeptide Y (NPY) and agouti-related peptide (AgRP), which stimulate FI and reduce EE [5,3]. This balance between hypothalamic peptides, is reflected in the balance between FI and EE. Chronic positive EB, characterized by increased FI and EE reduction, results in the obesity phenotype [6]. However, imbalances in other systems also contribute to this phenotype, as an example, the system of circadian rhythms that influence EB.

Some EB components oscillate in a circadian pattern, evidencing that they are part of the so-called group of genes controlled by the circadian clock [7,8]. These, oscillate in response to fluctuations in the expression of a set, called gene clocks [9]. We highlight the clock genes, *Bmal1* (Brain and Muscle Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator-like 1), *Cryptochrome* (*Cry*), *Period* (*Per*), besides the nuclear receptors *Rev-erb α* , β and *Ror* [9]. Together, they work in a transcriptional-translational feedback mechanism. The *Clock* and *Bmal1* genes activate the transcription of the *Cry*, *Per*, *Rev-erb* and *Ror* genes. *Cry* and *Per*, repress the transcription of these same genes, including their own [10,11]. The nuclear receptors *Rev-erb* and *Ror*, act differently on the transcription of the *Bmal1* gene. While the *REV-ERB α* protein, during the clear cycle, represses it, the *ROR* protein, during the dark cycle, the active [12,13]. An example of integration between EB and circadian rhythms was observed in mice with mutation in the clock gene. These present arrhythmicity in the expression of *CART* and *ghrelin*, in addition to hyperphagia, obesity and hyperglycemia [2]. Recent evidence indicates that imbalances in the rhythm system may contribute to the etiology of obesity and type 2 diabetes mellitus, such as are observed in patients with nocturnal eating syndrome and in shift workers [14,15,16] .

In this context, the REV-ERB α receptor is a molecular component of clocks considered as the link between circadian clocks and energy imbalance. Initially, this was classified as an orphan receptor by the absence of identification of its endogenous ligands. Today, it is known the existence of binding sites for small molecules such as heme, capable of increasing its function [17]. The REV-ERB α receptors are transcriptional repressive factors, however, their function can target both regulatory mechanisms of circadian clocks, and mechanisms that do not regulate clocks [18]. These latter mechanisms include the action of REV-ERB α on the metabolism of lipids [19], carbohydrates [20] and possibly on energy balance control. Obese mice treated with peripheral administration of the agonist of these receptors, although they do not present modifications in the food consumption, increase energy expenditure, reduce body mass and improve the metabolic profile [21]. Recent epidemiological studies indicate that polymorphisms in the REV-ERB α gene are involved with the obesity in the Spanish population [22], Mediterranean and North American [23], both in adults and adolescents [24].

These studies suggest the involvement of REV-ERB α receptors with energetic balance, so when there is an imbalance in these receptors this may be associated with the pathophysiology of obesity and metabolic disorders. However, little is known about its influence on hypothalamic energy balance control. Thus, the current study aimed to analyze the effects of central activation of REV-ERB α receptors on energy consumption and expenditure.

7.2.3 - Materials e methods:

7.2.3.1 - *Animals*

Male Wistar rats at 60-day old were purchased from Nutrition Department of Federal University of Pernambuco. The animals were housed under 12-h light-dark cycle (light off at 6am) at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ with free access to water and chow. All behavioral experiments were performed during the dark phase. Animal experiments were approved by Ethical Committee on Animal Experiments of the Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco (processing number: 23076.033268/2013-72).

7.2.3.2 - *Cannula Placement and REV-ERB α Administration*

In each rat was stereotactically implanted a unilateral cannula under anesthesia with intramuscular injection of ketamine (60mg/kg) and xylazine (7.5 mg/kg). The position of the cannula was in the right lateral ventricle (anteroposterior: -1.0 mm relative to Bregma; lateral: -2.0 mm relative to Bregma; dorsoventral: -5.0 mm below the skull, according to the stereotactic

Atlas of Paxinos and Watson). During five days, after surgery, animals received postoperative analgesia (paracetamol in drinking water, 2mg/100 mL) and pentabiotics (10µL/100g, single dose). The cannula placements into the lateral ventricle were verified by the Angiotensin-II method, as in Aja et al. [25] and by histological analysis.

A single dose of GSK 4112 (Cayman Chemical Company), a selective agonist for the REVERBα receptors, was administered. GSK 4112 has a pharmacokinetics with low systemic distribution [26]. This feature ensures that the effects of intracerebroventricular (i.c.v.) administration are exclusively central. Initially, two experimental groups were used, receiving doses of 5 and 10µg / rat, respectively, and vehicle group (aCSF and 25% DMSO), both with a volume of 5µl. We continued the experiments with a dose of 10µg because it has a greater potential to influence food behavior. In order to differentiate the central effects of the peripherals, the same dose was administered intraperitoneally (i.p.). The time of administration of the drug corresponds to the period of lower gene expression of the receptor, which occurs at the end of the clear period [27]. The drug was administered 1 hour before the onset of the dark period, and in this, because it was the wakeful period in rodents, it was chosen to perform the behavioral tests.

7.2.3.3 - Food Efficiency (FE):

After i.c.v. or i.p. drug or vehicle administration, food intake (IF) was recorded at 1, 2, 4 and 24 hour intervals. Body weight was measured at the time and after 24 hours at the application of the drug. These data allowed the evaluation of relative food intake, body weight (BW) gain and FE (ability to transform calories ingested into body mass).

7.2.3.4 - Rectal temperature:

The rectal temperature was recorded at the time of i.c.v. drug or vehicle administration and after the intervals of 1, 2, 3 and 4 hours. The values were expressed as temperature variation in relation to the basal value (Δ Temperature). The records were obtained with the aid of a high accuracy veterinary digital thermometer (Vet Thermometer) lubricated with mineral oil.

7.2.3.5 - Glucose Tolerance Test (GTT) and Insulin Tolerance Test (ITT):

After a fasted of 12 hours, basal glycemia (at time 0) was obtained in a sample of blood collected from the tail. For GTT test, 50% glucose solution (1mg/g, i.p.) was administered. For ITT, insulin solution at the dose of 0.75 mU (34.125ng, i.p.) was administered. Blood glucose was monitored at subsequent intervals of 15, 30, 45, 60 and 120 minutes using a glucometer (Accu

Check Performa Roche). In both tests, the area under the glycemia curve was obtained by the glucose values at the points analyzed using the trapezoidal method [28].

7.2.3.6 - *Open field:*

It was analyzed the length of stay in the three areas of the open field, considered a parameter that allows access to stress levels [39]. In addition, the energy expenditure induced by physical activity (PAEE) was evaluated. Total EE is divided into 3 components: basal metabolic rate, diet-induced heat production and PAEE, which comprises the calories used for movement [30]. Here, we carried out analysis of locomotor activity in order to determine PAEE following the method described by Aragão et al., (2012) and Silva et al., (2016) [31,32]. In this method, the calories expended by the animal are calculated from kinetic energy values obtained from locomotion parameters [31,32]. Physical activity has been already used by other authors as an indicator of EE in sibutramine-treated rats. Thus, rats were placed in the center of a field and their free movement was recorded by a monitoring apparatus for 5 minutes (Open field), a well-accepted interval time among the authors [29]. The analysis of locomotor activity was carried out by measuring the following variables: Distance traveled (m), Rotational displacement (m), Average speed (m/s), Average potency (mW), Time immobile (s), Number of stops, Time immobile/number of stops (s), corresponds to the ratio between the time immobile and the total number of stops.

7.2.3.7 - *Continuous recording of animal activity:*

The rats were kept in individual cages and a motion sensor was positioned 15 cm above the cage to capture movements at any point of the cage. The sensor was coupled to a continuous motion recording system that counted the activity time (s) of each animal.

7.2.4 - Statistical analysis:

Data were evaluated for distribution by three tests of Normality, Kolmogorov-smirnov, D'Agostino and Shapiro-Wilk. We performed two-way ANOVA for food consumption analyzes at different time intervals, body temperature and glucose and insulin tolerance tests. ANOVA one way was performed in food efficiency analyzes in the three groups (agonist 5µg, 10µg and vehicle). The unpaired Student t test was performed in the analysis of open field parameters, continuous recording of locomotor activity and area under the curve in glucose and insulin tolerance tests. Values are expressed as mean ± SE. A value of $P < 0.05$ was considered significant. GraphPad Prism 5 was used for Graphs and Statistics.

7.2.5-Results

7.2.5.1 - FE after 24-hour fasting:

In order to evaluate the central effects of the REV-ERB α receptor agonist on FI and BW, we performed the FE test. Faced with the potential of the agonist to promote negative energy balance, rats were tested after a 24-hour fast. FI after 1 and 2 hour did not show difference between the agonist and vehicle treated groups (Figure 1A). While in the 4 and 24 hour intervals, there was a dose-dependent increase of FI in the groups treated with 5 μ g and 10 μ g. Only the group treated with the dose of 10 μ g presented an increase (Figure 1A). Coherent to the increase in FI, in the groups treated with the agonist, there was a dose-dependent increase in BW gain (Figure 1B) and FE (Figure 1C), also for the group treated with dose of 10 μ g. These results suggest that the central administration of the agonist to REV-ERB α receptors contributes to positive energy balance. To separate peripheral effects from the central, if the dose crossed the blood-brain barrier, the agonist dose of 10 μ g was administered (i.p.) and we performed the FE test after a 24-hour fast. There were no differences between IF at the 1, 2, 4 and 24 hour intervals after this administration, as well as in BW gain and FE (Figures 2A, B, C). Together these results show that the present effects on consumption and FE in the groups treated with injection (i.c.v.) of agonist is exclusively a result of its central action.

7.2.5.2 - Retal Temperature:

Given the observation of increased BW and FE in the group treated with the agonist, we recorded rectal temperature to check whether this group has reduced thermogenesis. As in the FE test, the temperature was measured in animals after a 24-hour fast. We observed a tendency to reduce the Δ Temperature within 3 hours after application of the agonist (Figure 1D).

7.2.5.3 - GTT e ITT:

In the GTT test, there was an increase in glycemic levels within 30 minutes after glucose administration in the treated (i.c.v.) group with the agonist (Figure 3A). This group also presented an increase in the area under the curve in relation to the vehicle group, evidencing an overall increase in glycemic levels (Figure 3B). These results show that central administration of the REV-ERB α receptor agonist decreases glucose uptake. While the group treated (i.p.) with the agonist showed no differences in glycemic levels compared to the vehicle (Figure 2D). Together, these results show that the reduction of glucose tolerance observed in the treated group (i.c.v.) with the agonist, is the result of its exclusively central action.

In the ITT test, no differences were observed in the glycemic levels and in the area under the glucose curve between the experimental groups (Figures 3C, D). Therefore, the central administration of the agonist of these receptors does not alter insulin sensitivity.

7.2.5.4 - *Open Field and Continuous recording of locomotor activity:*

We performed these tests to determine if the drug could induce discomfort or stress, reducing locomotor activity and increasing FE. Among the groups analyzed, we did not observe differences in the parameters indicative of anxious behavior, which correspond to length of stay in the three areas of the open field (Table 1). Surprisingly, we observed increased locomotor activity in the group treated with the agonist, reflected in the increase of the parameters of Average Potency (Figure 4B), Distance traveled (Figure 4C), and Average Speed (Figure 4E). In addition, the group treated with the agonist also presented increase of PAEE (Figure 4A). In the other parameters of Rotational Displacement (Figure 4D), Time Immobile (Figure 4F) Number of Stops (Figure 4G), and Time immobile/number of stops (Figure 4H) there were no differences between the groups. Similarly, continuous recording of locomotor activity also recorded increased total motion in the group treated with the agonist (Figures 4I, J). These results are in contrast to those of positive energy balance. As both tests were performed under ad libitum conditions to minimize fasting stress. The increased locomotor activity suggests that the effects of central receptor activation may be inversely dependent on the nutritional status of the organism.

7.2.5.5 - *FE ad libitum:*

Facing the findings of the locomotor activity, we performed the FE test under ad libitum conditions. No changes were observed in FI, body mass gain and FE between the treated group and the vehicle (Figures 5A, B, C). Together, these results suggest that central administration of the REV-ERB receptor agonist may contribute to a positive energy balance. However, their effects may depend on the energy status of the organism.

7.2.6 - *Discussion*

Our results show that activation of hypothalamic REV-ERB α receptors promotes increased BW, FI and FE gain in a dose-dependent manner. Esses achados resultam da ativação exclusivamente central desses receptores. To date, no study has demonstrated the influence of the REV-ERB α receptor on FI. Epidemiological study demonstrated that polymorphisms in the Rev-erb α gene leads to the obesity phenotype, however, no relationship was found with the FI

[23]. In addition, peripheral activation of these receptors does not alter FI, although they reduce BW in obese rats [21]. Our study is the first to demonstrate that hypothalamic REV-ERB α receptors act on the control of EB and are able to alter FI. The possible mechanisms involved in this action are still unknown. Such mechanisms may be linked to circadian clocks or to the independent mechanisms of these clocks [18]. Regarding clock-related mechanisms, we know that REV-ERB α represses the transcription of the *Bmal1* gene. The BMAL1 and CLOCK proteins together form a heterodimer, CLOCK; BMAL1, which activate the expression of genes carrying the E-box element in their promoter regions [10], among them *Cart* [7], which encodes the CART anorectic hypothalamic peptide. Therefore, the activation of the REV-ERB α receptors in the hypothalamus can reduce the expression of the *Bmal1* gene and, consequently, of *Cart*. Although we have not measured the expression of the *Bmal1* and *Cart* genes, the reduction of the expression of both genes may explain the increase in FI and the increase in FE observed in this study. Regarding possible pathways that link REV-ERB α with EB control, the mechanism is also unknown. However, it has recently been shown that the peripheral activation of the REV-ERB α and β receptors also promote modulation of orexins (orexigenic peptide) in the hypothalamus, although the study did not analyze FI [33].

The increase in BW and FE gain is indicative that the central action of the REV-ERB α receptor agonist has effects on energy expenditure. As thermogenesis analysis, we performed the rectal temperature measurement. It consists of a technique used by several authors to measure thermogenesis [34,35], and is considered indicative of central temperature [36]. In the current study, we observed a tendency to lower the temperature within 3 hours after drug administration. This small reduction in body temperature plus the increase in IF is consistent with the increase in BW and FE gain. The hypothalamus is an important site of the Central Nervous System involved in thermoregulation. Its paraventricular region receives dense amounts of Suprachiasmatic Nucleus (NSQ) projections, commanding the circadian pattern of thermoregulation [37]. In view of this, REV-ERB α receptors may have contributed to the small reduction in rectal temperature observed in the present study. In brown adipose tissue, this receptor affects thermogenesis modulating *Ucp-1* gene expression [38]. However, the action of the REV-ERB α receptor on the hypothalamus on thermogenesis deserves to be detailed with further studies. Some hypothalamic peptides are also part of the central control of thermogenesis. NPY reduces thermogenesis [39]. CART has recently been pointed out as capable of modulating temperature in brown adipose tissue [40]. As mentioned, we do not

measure CART expression, but a possible reduction in its expression can produce, at least in part, the response we observe.

Energy metabolism was also altered by central activation of the REV-ERB α receptors. In the treated (i.c.v.) animals with REV-ERB α agonist, we observed an reduction of glucose tolerance. The same dose administered intraperitoneally did not alter glycemic levels, evidencing that reduction of glucose tolerance resulted from the exclusively central activation of the receptors. These evidences contrast with those observed in the peripheral activation of the REV-ERB α receptors, which reduce glycemic levels in obese rats [21]. This reduction can be explained by the fact that in the pancreas, the activation of these receptors induces insulin secretion [41]. Furthermore, heme represses the transcription of genes linked to gluconeogenesis in the liver, such as phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose 6 phosphate (G6P) [42]. However, to date, no study has shown the repercussions of hypothalamic REV-ERB α receptor activation on energy metabolism. Together, the differences between our results and the evidence in the literature suggest that the REV-ERB receptor agonist may act in a tissue-dependent manner. Reduction of glucose tolerance resulting from activation of the central REV-ERB α receptors probably enables the body to supply energy to the brain, as it increases the FI and reduces the absorption of glucose.

The mechanisms underlying the reduction of glucose tolerance due to the activation of hypothalamic REV-ERB α receptors are not clear, however, the repression of hypothalamic Bmal1 may comprise these mechanisms. Bmal1 deficient mice present reduced insulin secretion and hyperglycemia [43]. In addition, the independent mechanisms of clocks may also be active. The balance between hypothalamic peptides may also have an effect on blood glucose. Deficiency in POMC, for example, may result in impaired glucose tolerance [44]. However, the involvement of BMAL1 and orexigenic peptides in the reduction of glucose tolerance induced by the REV-ERB α receptor need to be studied. In our study, we did not observe changes in insulin sensitivity due to the central activation of REV-ERB α . Similarly, mice deficient in the Rev-erb α gene also do not show alterations in this sensitivity [45]. Together, our results show that activation of hypothalamic REV-ERB α receptors induces reduction of glucose tolerance, probably due to the reduction of insulin secretion, without altering insulin sensitivity.

Although REV-ERB α receptors may influence anxiety levels [46], we did not identify differences in length of stay in the three areas of the open field in animals treated with the

agonist. Rats present the so-called behavior of tigmotaxis, which corresponds to walking near walls [47]. This result shows that the central activation of receptors does not alter anxiety levels and that the results of food consumption and locomotor activity were not interfered with by increased levels of anxiety or malaise. In open field test, we also observed increased locomotor activity and, consequently, PAEE. These results are consistent with those observed in mice with deficiency of REV-ERB α receptors that presented less efficiency of physical activity and in content of muscle fiber mitochondria [48]. In addition, administration (i.p.) of agonist elevates locomotor activity and induces wakefulness [46]. In our study, however, the administration of the agonist was by intracerebroventricular route. Although additional studies are required, we suggest that alterations in the expression of Bmal1 genes and anorexigenic hypothalamic peptides may explain the influence of central REV-ERB α on locomotor activity. Some evidence supports this possibility. The presence of Bmal1 gene in encephalic structures is necessary for the modulation of locomotor activity in the Anticipatory Food Activity (FAA) [49], in rats under food restriction. And, NPY and AgRP have regulatory influences on locomotor activity [50,51].

However, we highlight the apparent contradiction when we compare our results of increasing BW gain to those of PAEE increase. It can be explained by a methodological difference. To minimize stress, open field testing was performed on rats fed ad libitum. The FE test was performed after a 24-hour fast. This suggests that the energetic status of the cell may influence the response of the REV-ERB receptor to its agonist. There is evidence that this receptor has a role in physiological responses to food restriction. It has recently been shown that mice deficient in the Rev-erb α gene in the brain and under food restriction are unable to develop AAA. In addition, they present a fragmented and arrhythmic locomotor behavior [52]. To assure this information, we measured FI and BW gain within 24 hours after administration (i.c.v.) of the agonist in animals fed ad libitum. The treatment did not change FI, and tended to reduce the gain of BW and FE. The tendency to reduce these parameters may result from a transient increase in PAEE. The open field test allows punctual analysis and we do not have the guarantee that the PAEE remained high in the subsequent hours. In addition, we do not measure the energy expenditure by indirect calorimetry or thermogenesis. They provide further explanations of the increase in PAEE and its little influence on BW. However, fasting or absence of it influenced the agonist's response, giving indications that the REV-ERB receptor has its action influenced by the energetic status of the cell. The reduction of the NAD (P) H / NAD (P) + ratio increases the activity of SIRT1 which suppresses the activity of the heterodimer CLOCK: BMAL1,

influencing the transcription of the clock genes, including Rev-erb α [53]. Although little known, the functions of the REV-ERB α receptors include the detection of the redox state [54] and metabolic cell [55]. An example has recently been demonstrated in rats fed an iron-rich diet. This element promotes increase of the reactive oxygen species and reduction of the ratio NAD (P) H / NAD (P) +. The NAD (P) H / NAD (P) + ratio activates PGC-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator) which increases heme expression. Heme binding to the REV-ERB α receptors, considered as heme sensors, inhibit the transcription of genes belonging to the gluconeogenesis pathway in the liver. The paradox of reduction of NAD (P) H / NAD (P) + ratio and gluconeogenesis is justified by the authors of these studies as resulting from complex pathways involving numerous components [56]. In addition, heme is also an O₂ sensor, and its levels may regulate glucose metabolism in the liver [57].

Taken together, we conclude that the activation of the hypothalamic REV-ERB α receptors acts on the EB increasing FI and BW gain, in addition to hyperglycemia. As they contrast with the results obtained by the activation of peripheral receptors, we suggest that the action of the agonist on EB is given in a tissue-dependent manner. In addition, we have evidence that the function of these receptors may also be influenced by the energetic state of the cell. However, studies need to be performed to understand the functions of the central REV-ERB α receptors in the control of EB, as well as the interferences of the metabolic state of the organism.

7.2.7 - References:

- 1- Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(9):1431-7.
- 2- Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 2005;308(5724):1043-5.
- 3- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM.. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995;269(5223):543-6.
- 4- Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhaj MJ, Saper CB, Elmquist JK. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*. 1998; 21 (6):1375-85. 23.
- 5- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl AcadSci U S A*. 1998; 95(25):15043-8.
- 6- Cota D, Proulx K, Seeley RJ. The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology*. 2007; 132(6):2158-68.
- 7- Yamada K, Yuan X, Otabe S, Koyanagi A, Koyama W, Makita Z. Sequencing of the putative promoter region of the cocaine- and amphetamine-regulated-transcript gene and identification of polymorphic sites associated with obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26(1):132-6.
- 8- Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, et al. Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology*. 2004;145(9):4144-53.
- 9- Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 1999;96(2):271-90.
- 10- Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, et al. Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell*. 2001;105(5):683-94.
- 11- van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, et al. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*. 1999;398(6728):627-30.
- 12- . Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. 2002;110(2):251-60.
- 13- Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002 Aug 29;418(6901):935-41.
- 14- Di Lorenzo L, De Pergola G, Zocchetti C, et al. Effect of shift work on body mass index: results of a study performed in 319 glucose-tolerant men working in a Southern Italian industry. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003; 27, 1353–1358

- 15- Schwandt B, de Zwaan M, Jager B. Co-morbidity between type 2 diabetes mellitus and night eating. *Psychother Psychosom Med Psychol.* 2012;62(12):463–468
- 16- Goel N, Stunkard AJ, Rogers NL, Van Dongen HP, Allison KC, O'Reardon JP, Ahima RS, Cummings DE, Heo M, Dinges DF. Circadian Rhythm Profiles in Women with Night Eating Syndrome. *J Biol Rhythms.* 2009; 24(1): 85–94.
- 17- Raghuram S, Stayrook KR, Huang P, Rogers PM, Nosie AK, McClure DB, Burris LL, Khorasanizadeh S, Burris TP, Rastinejad F. Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β . *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(12):1207-13. Epub 2007 Nov 25.
- 18- Butler AA, Burris TP. Segregation of Clock and Non-Clock regulatory functions of Rev-erb. *Cell Metab.* 2015;22(2):197-8
- 19- Vieira E, Marroquí L, Figueroa AL, Merino B, Fernandez-Ruiz R, Nadal A, Burris TP, Gomis R, Quesada I. Involvement of the clock gene Rev-erb α in the regulation of glucagon secretion in pancreatic α -cells. *PLoS One.* 2013;8(7):e69939.
- 20- Raspe E, Duez H, Mansen A, Fontaine C, Fievet C, Fruchart JC, Vennstrom B, Staels B. Identification of Rev-erb α as a physiological repressor of apoC-III gene transcription. *J Lipid Res* 43: 2172–2179, 2002.
- 21- Solt LA, Wang Y, Banerjee S, Hughes T, Kojetin DJ, Lundasen T, Shin Y, Liu J, Cameron MD, Noel R, Yoo SH, Takahashi JS, Butler AA, Kamenecka TM, Burris TP. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonist. *Nature.* 2012;485(7396):62-8.
- 22- Ruano EG, Canivell S, Vieira E. REV-ERB ALPHA polymorphism is associated with obesity in the Spanish obese male population. *PLoS One.* 2014;9(8):e104065.
- 23- Garaulet M, Smith CE, Gomez-Abellán P, Ordovás-Montañés M, Lee YC, Parnell LD, Arnett DK, Ordovás JM. REV-ERB-ALPHA circadian gene variant associates with obesity in two independent populations: Mediterranean and North American. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(4):821-9.
- 24- Goumidi L, Grechez A, Dumont J, Cottel D, Kafatos A, Moreno LA, Molnar D, Moschonis G, Gottrand F, Huybrechts I, Dallongeville J, Amouyel P, Delaunay F, Meirhaeghe A. Impact of REV-ERB α gene polymorphisms on obesity phenotypes in adult and adolescent samples. *Int J Obes (Lond).* 2013;37(5):666-72.
- 25- Aja S, Bi S, Knipp SB, McFadden JM, Ronnett GV, Kuhajda FP, Moran TH. Intracerebroventricular C75 decreases meal frequency and reduces AgRP gene expression in rats. *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol.* 2006; 291(1):148-54
- 26- Grant D, Yin L, Collins JL, Parks DJ, Orband-Miller LA, Wisely GB, Joshi S, Lazar MA, Willson TM, Zuercher WJ. GSK4112, a small molecule chemical probe for the cell biology of the nuclear heme receptor Rev-erb α . *ACS Chem Biol.* 2010 Oct 15;5(10):925-32.

- 27- Patel SA, Velingkaar N, Makwana K, Chaudhari A, Kondratov R. Calorie restriction regulates circadian clock gene expression through BMAL1 dependent and independent mechanisms. *Sci Rep*. 2016;6:25970.
- 28- Le Floch JP, Escuyer P, Baudin E, Baudon D, Perlemuter L. Blood glucose area under the curve. Methodological aspects. *Diabetes Care*. 1990;13(2):172-5.
- 29- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003; 463(1-3):3-33.
- 30- Westerterp KR. Physical activity and physical activity induced energy expenditure in humans: measurement, determinants and effects. *Front Physiol*. 2013;26:4-90.
- 31- Aragão R da S, Rodrigues MA, de Barros KM, Silva SR, Toscano AE, de Souza RE, Manhães-deCastro R. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents a reproducibility study. *J Neurosci Methods*. 2011;195(2):216-21.
- 32- Silva KO, Pereira Sda C, Portovedo M, Milanski M, Galindo LC, Guzmán-Quevedo O, Manhães-de-Castro R, Toscano AE. Effects of maternal low-protein diet on parameters of locomotor activity in a rat model of cerebral palsy. *Int J Dev Neurosci*. 2016;52:38 -45.
- 33- Amador A, Wang Y, Banerjee s, Kameneka TM, Solt LA, Burris TP. Pharmacological and Genetic Modulation of REV-ERB activity and expression. Affects orexigenic gene expression. *PLos One*. 2016;11(3):e0151014.
- 34- Shintani M, Tamura Y, Monden M, Shiomi H. Thyrotropin-releasing hormone induced thermogenesis in Syrian hamsters: site of action and receptor subtype. *Brain Res*. 2005;1039(1-2):22-9.
- 35- Moriya R, Sano H, Umeda T, Ito M, Takahashi Y, Matsuda M, Ishihara A, Kanatani A, Iwaasa H. RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology*. 2006;147(6):2916-22.
- 36- Cattaneo CG, Frank SM, Hesel TW, El-Rahmany HK, Kim LJ, Tran KM. The accuracy and precision of body temperature monitoring methods during regional and general anesthesia. *Anesth Analg*. 2000;90(4):938-45.
- 37- Lu J, Zhang YH, Chou TC, Gaus SE, Elmquist JK, Shiromani P, Saper CB. Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(13):4864–4874.
- 38- Gerhart-Hines Z, Feng D, Emmett MJ, Everett LJ, Loro E, Briggs ER, Bugge A, Hou C, Ferrara C, Seale P, Pryma DA, Khurana TS, Lazar MA. The nuclear receptor Rev-erba controls circadian thermogenic plasticity. *Nature*. 2013;503(7476):410-3.
- 39- Levine AS, Jewett DC, Cleary JP, Kotz CM, Billington CJ. Our journey with neuropeptide Y: effects on ingestive behaviors and energy expenditure. *Peptides* 2004; 25: 505–510.

- 40- Lau j, Shi YC, Herzog H. Temperature dependence of the control of energy homeostasis requires CART signaling. *Neuropeptides*. 2016;59:97-109.
- 41- Nishiyama K, Hirai K. The melatonin agonist ramelteon induces duration-dependent clock gene expression through cAMP signaling in pancreatic INS-1 β -cells. *PLoS One*. 2014;9(7):e102073.
- 42- Yin L, Wu N, Curtin JC, Qatanani M, Szwegold NR, Reid RA, Waitt GM, Parks DJ, Pearce KH, Wisely GB, Lazar MA. Rev-erb α , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science*. 2007;318(5857):1786-9.
- 43- Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, Lopez JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang X, Takahashi JS, Bass J. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 2010;466(7306):627-31.
- 44- Chhabra KH, Adams JM, Fagel B, Lam DD, Qi N, Rubinstein M, Low MJ. Hypothalamic POMC Deficiency Improves Glucose Tolerance Despite Insulin Resistance by Increasing Glycosuria. *Diabetes*. 2016;65(3):660-72.
- 45- Delezie J, Dumont S, Dardente H, Oudart H, Gréchez-Cassiau A, Klosen P, Teboul M, Delaunay F, Pévet P, Challet E. The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *FASEB J*. 2012;26, 3321–3335.
- 46- Banerjee S, Wang Y, Solt LA, Griffett K, Kazantzis M, Amador A, El-Gendy BM, Huitron-Resendiz S, Roberts AJ, Shin Y, Kamenecka TM, Burris TP. Pharmacological targeting of the mammalian clock regulates sleep architecture and emotional behaviour. *Nat Commun*. 2014 ;5:5759.
- 47- Kopp C, Misslin R, Vogel E, Rettori MC, Delagrangé P, Guardiola-Lemaitre B. Effects of day-length variations on emotional responses toward unfamiliarity in Swiss mice. *Behav Processes*. 1997;41(2):151-7.
- 48- Woldt E, Sebt Y, Solt LA, Duhem C, Lancel S, Eeckhoutte Matthijs J, Hesselink KC, Paquet C, Delhaye S, Shin Y, Kamenecka TM, Schaart G, Lefebvre Nevière R, Burris TP, Schrauwen P, Staels B, Duez H. Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med*. 2013;19(8): 1039–1046.
- 49- Mieda M, Sakurai T. Bmal1 in the nervous system is essential for normal adaptation os circadian locomotor activity and food intake to periodic feeding. *J Neurosci*. 2011;31(43):15391-6.
- 50- Huang H, Lee SH, Ye C, Lima IS, Oh BC, Lowell BB, Zabolotny JM, Kim YB. ROCK1 in AgRP neurons regulates energy expenditure and locomotor activity in male mice. *Endocrinology*. 2013; 154(10):3660-70.
- 51- Lian J, De Santis M, He M, Deng C. Risperidone-induced weight gain and reduced locomotor activity in juvenile female rats: The role of histaminergic and NPY pathways. *Pharmacol Res*. 2015; 95-96:20-6.

- 52- Delezie J, Dumont S, Sandu C, Reibel S, Pevet P, Challet E. Rev-erb α in the brain is essential for circadian food entrainment. *Sci Rep*. 2016;6:29386.
- 53- Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*. 2009;324(5927):654-7.
- 54- Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther*. 2006;111(2):327-45.
- 55- Everett LJ, Lazar MA. Nuclear receptor Rev-erb α : up, down, and all around. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(11):586-92.
- 56- Simcox JA, Mitchell TC, Gao Y, Just SF, Cooksey R, Cox J, Ajioka R, Jones D, Lee SH, King D, Huang J, McClain DA. Dietary iron controls circadian hepatic glucose metabolism through heme synthesis. *Diabetes*. 2015;64(4):1108-19.
- 57- Jungermann K, Kietzmann T. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int*. 1997;51(2):402-12.

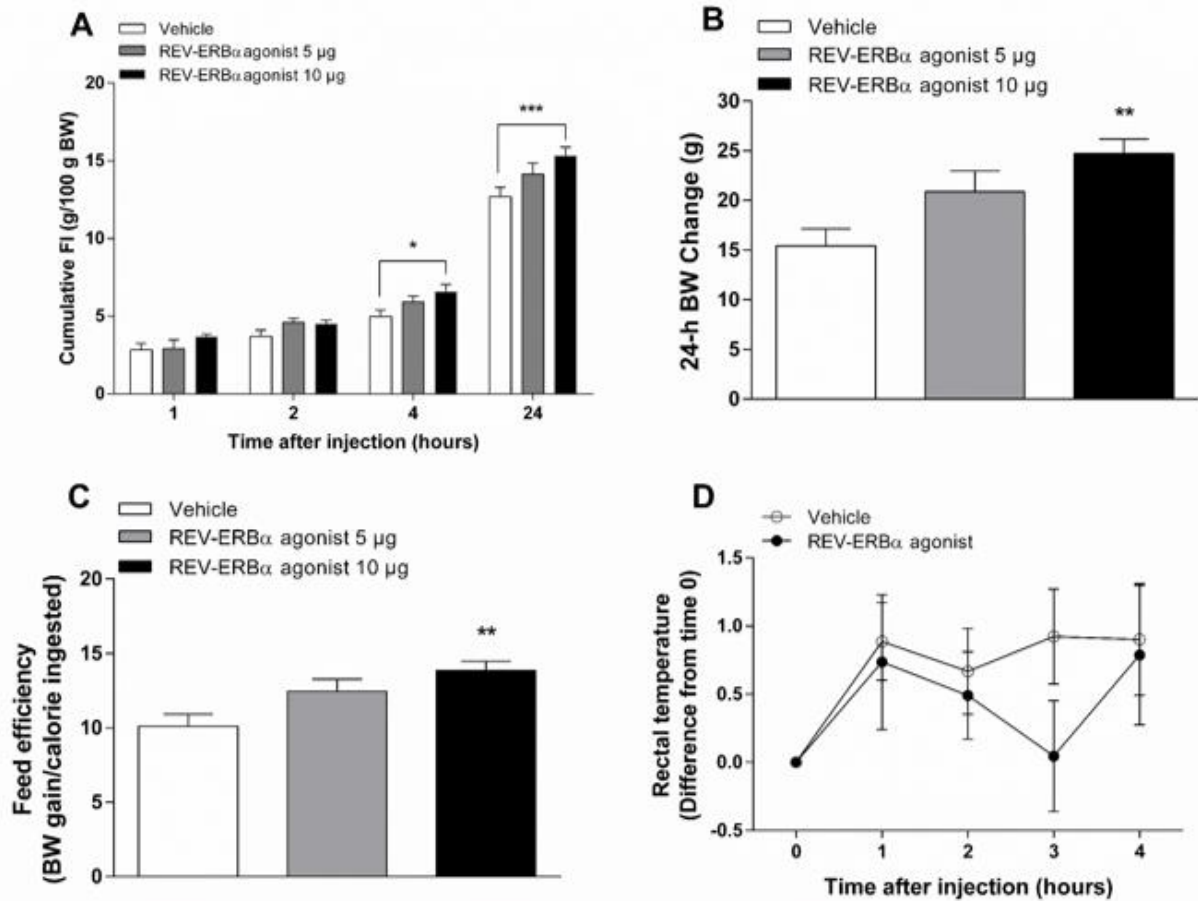


Figure 1: Effects of i.c.v. of the REV-ERB α agonist on FI, BW, FE and rectal temperature. After the 24 hour fast, the rats were submitted to agonist administration (5 μ g/5 μ l, N = 10 and 10 μ g/5 μ l, N = 10) or vehicle (5 μ l, N = 10) followed by feed offer. At the 1, 2, 4 and 24 hour intervals, food consumption was measured (A). 24 hours after drug administration, the change of BW (B) and FE (C) was recorded. Rectal temperature was measured at the intervals of 1, 2, 3 and 4 hours after agonist (10 μ g/5 μ l, N = 10) or vehicle (5 μ l, N = 10) (D). Values expressed as mean $\pm$ EP, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, ** $p < 0.01$. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test..

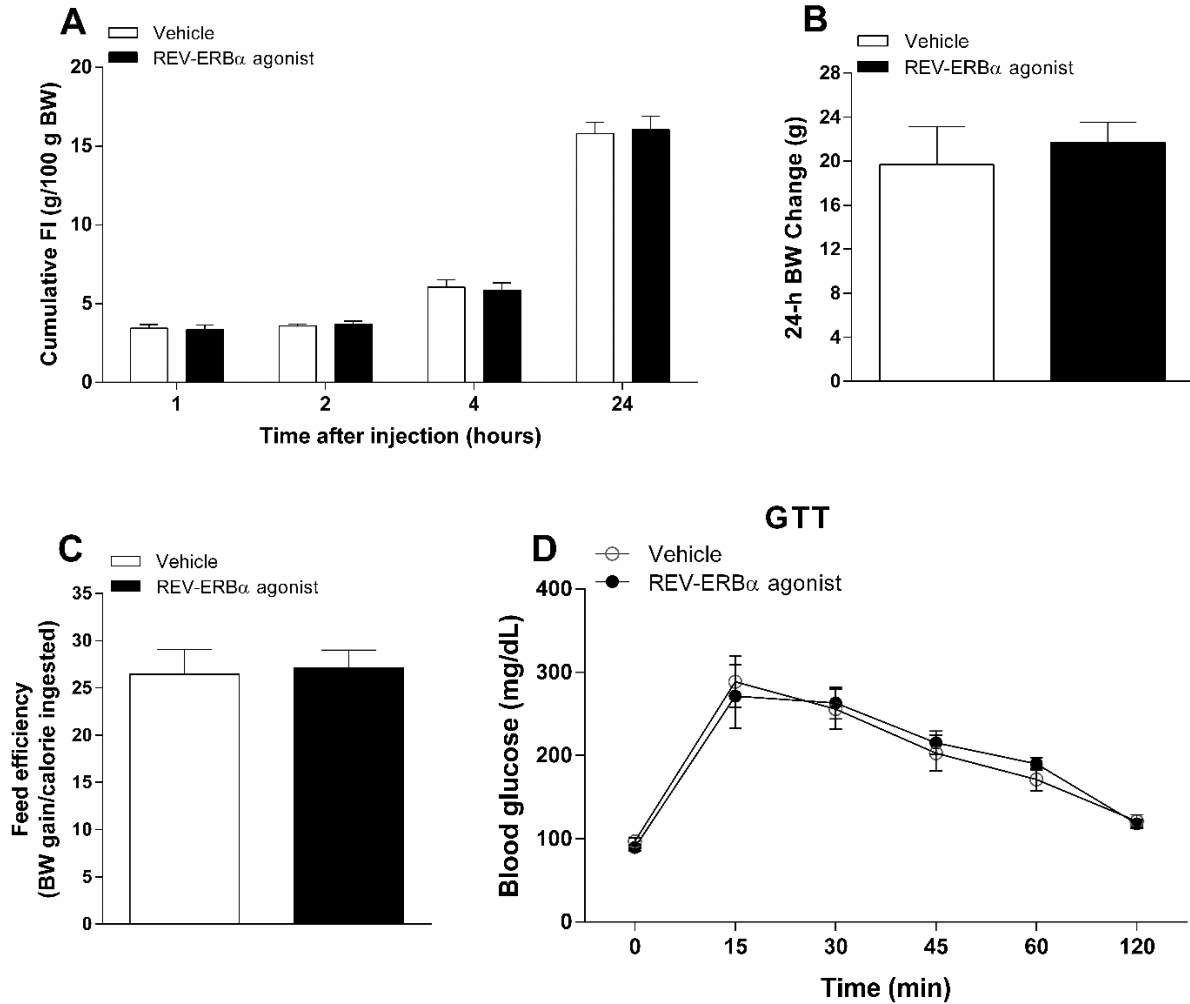


Figure 2: Effects of i.p. of the REV-ERB α agonist on FI, BW, FE and glucose tolerance. After the 24 hour fast, rats were submitted to agonist administration (10 μ g / 0.5ml, N = 6) or vehicle (0.5ml, N = 6) followed by feed offer. At the 1, 2, 4 and 24 hour intervals, food consumption was measured (A). 24 hours after drug administration, the change of BW (B) and FE (C) was recorded. GTT was performed on mice under 12-hour fasting. After an 11-hour fast, the mice were given agonist (10 μ g / 0.5ml, N = 7) or vehicle (0.5ml, N = 6). 1 hour after drug administration, the animals received i.p. of glucose 50% (1mg / g) followed by glycemia in the subsequent 15, 30, 45, 60 and 120 minutes intervals (D). Values expressed as mean $\pm$ EP.

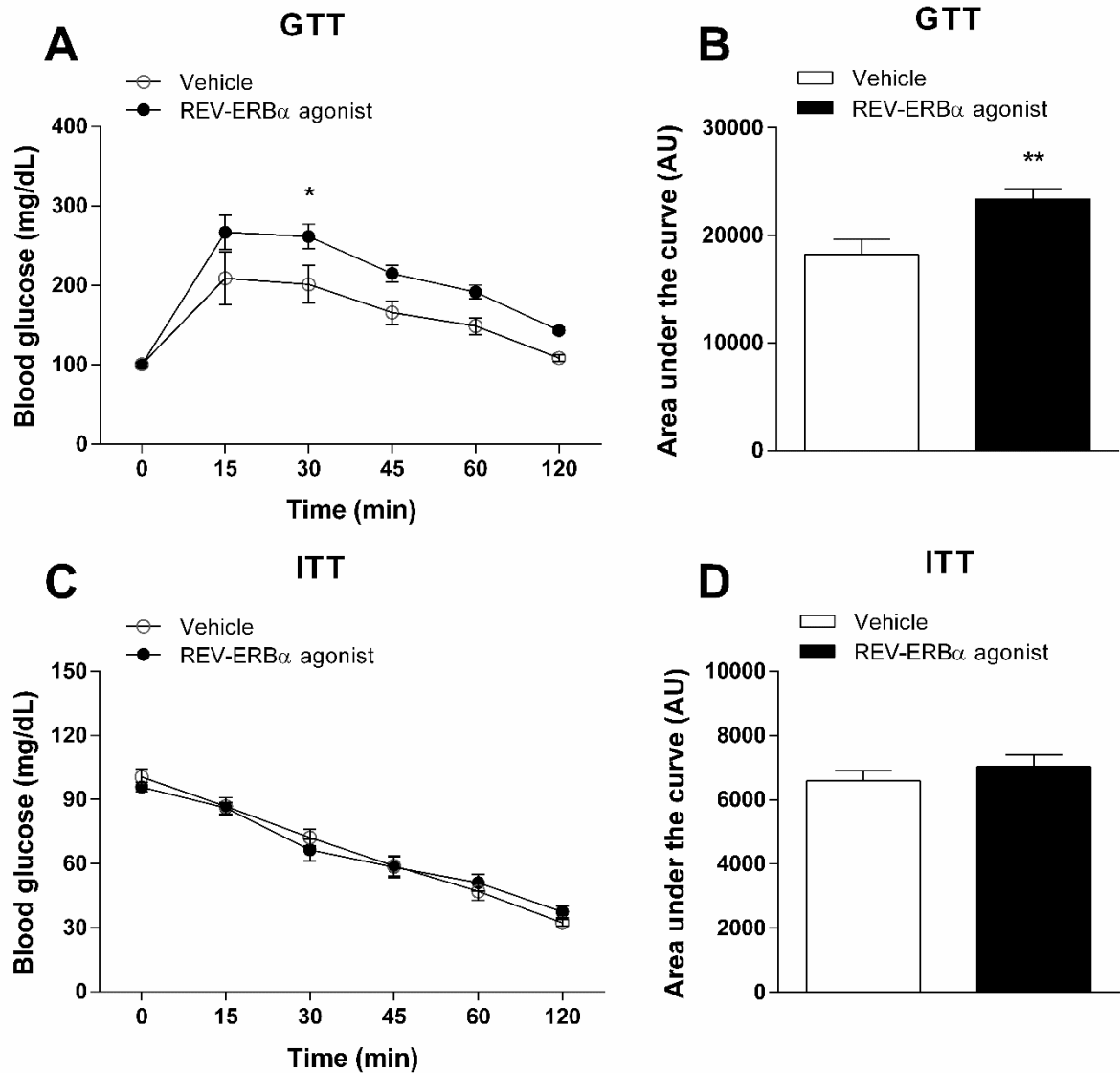


Figure 3: Effects of i.c.v. of the REV-ERB α agonist on glucose and insulin tolerance. GTT and ITT tests were performed on 12-hour fasting animals. After an 11-hour fast, the rats were submitted to agonist administration (10 μ g/5 μ l, N = 10) or vehicle (5 μ l, N = 10). In GTT, 1 hour after drug administration, the mice received i.p. of 50% glucose (1mg / g) followed by blood glucose measurement at subsequent intervals of 15, 30, 45, 60 and 120 minutes (A) and calculation of AUC (B). At ITT, they received i.p. of insulin at the dose of 0.75 mU (34.125 ng / g) followed by measurement at the same intervals (C) and AUC (D) calculation. Values expressed as mean $\pm$ EP, * $p < 0.05$. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, ** $p < 0.01$. Unpaired Student's t test.

Table1: Effects of i.c.v. injection of REV-ERB α agonist on the length of stay in the area of open field during locomotor activity.

	Vehicle	REV-ERBα agonist	p
Time in area 1 (s)	12,81 $\pm$ 5,014	9,283 $\pm$ 2,825	0,5479
Time in area 2 (s)	34,10 $\pm$ 5,847	31,92 $\pm$ 6,282	0,8025
Time in area 3 (s)	253,2 $\pm$ 8,093	258,9 $\pm$ 8,693	0,6393

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Student t test.

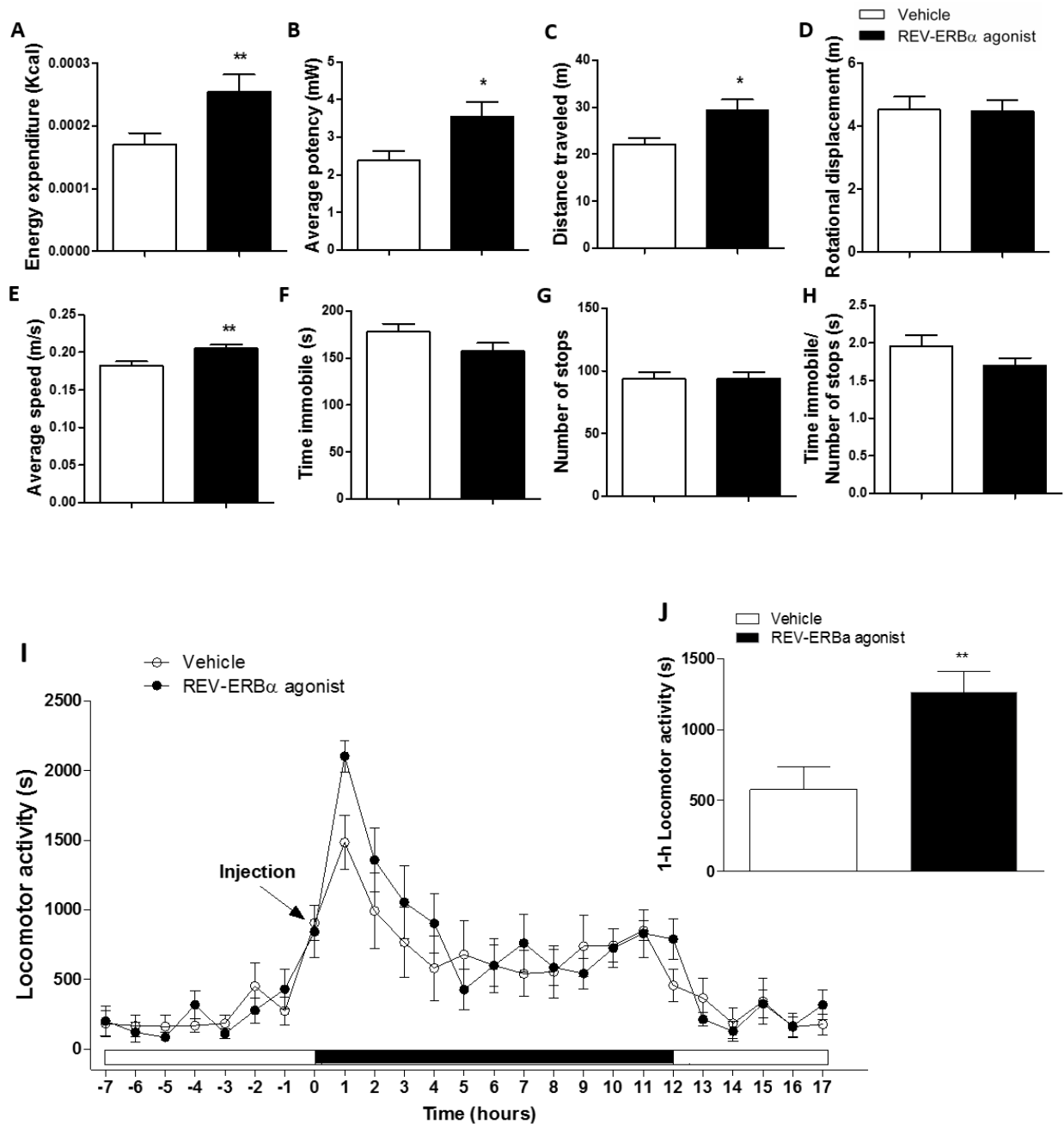


Figure 4: Effects of i.c.v. of the REV-ERB α agonist on parameters of locomotor activity and continuous recording of activity. After 1 hour of agonist administration (10 μ g/5 μ l, N = 10) or vehicle (5 μ l, N = 10), rats were placed in the open field for 5 minutes. The parameters of Energy expenditure (kcal) (A), Average potency (mW) (B), Distance traveled (C), Rotational displacement (D), Average speed (m/s), Time immobile (s) (F), number of stops (G), time immobile / number of stops (s) (H) were recorded. The continuous recording of movement time in 60-minute intervals, before and after the administration of the agonist (10 μ g/5 μ l, N = 8) or vehicle (5 μ l, N = 8) at the end of the light cycle (I). Activity time record 1 hour after agonist administration. Values expressed as mean $\pm$ EP, * P < 0.05, ** p < 0.01 Unpaired Student's t test

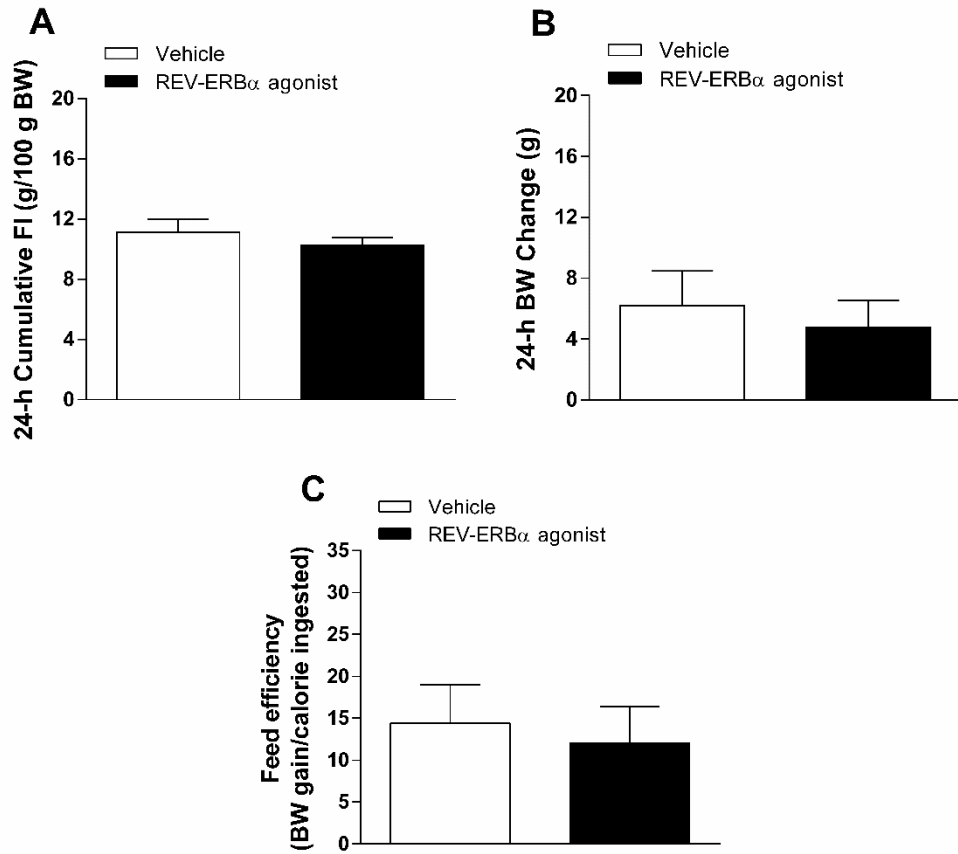


Figura 5: Effects of i.c.v. of the REV-ERB α agonist on FI, BW, FE in animals fed *ad libitum*. The rats were submitted to agonist (10 μ g/5 μ l, N = 9) or vehicle (5 μ l, N = 7) followed by feed offer. 24 hours after administration, food intake was measured (A), change of BW (B) and FE (C). Values expressed as mean $\pm$ EP.

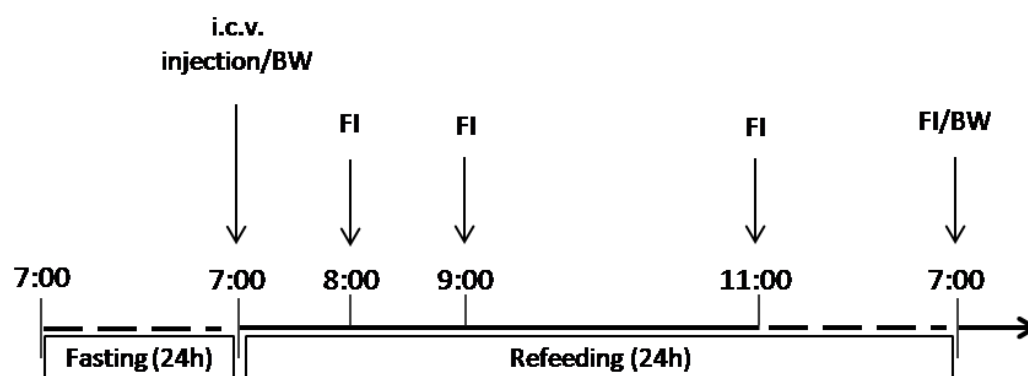


Figure S1: Food efficiency test design.

8.DISSCUSSÃO:

Nossos resultados evidenciam a participação dos receptores nucleares de glicocorticoides e REV-ERB α no controle do balanço energético.

Para testarmos a primeira hipótese, objetivamos a análise dos efeitos da ativação dos receptores nucleares de glicocorticoides periféricos e hipotalâmicos sobre testes comportamentais que permitem a avaliação do consumo alimentar e gasto energético induzido pela atividade física em ratos wistar. Nós observamos que animais tratados com agonista desses receptores, a dexametasona, pela via de administração intraperitoneal, apresentaram aumento no consumo alimentar às 10h e também no intervalo de 12 horas após a administração da droga. Esses resultados foram complementados com os do teste de Sequencia Comportamental de Saciedade. Neste teste, não observamos alterações no ponto de saciedade e consumo alimentar relativo. No entanto, apesar de 1 hora após a exposição ao agonista não ter alterado o ponto de saciedade, observamos que a ativação periférica dos receptores de glicocorticóides reduziu gasto energético induzido pela atividade física. Quando o agonista foi administrado pela via intracerebroventricular, observamos que os animais tratados apresentaram um aumento no consumo alimentar às 10h, bem como no intervalo de 12 horas após a administração do agonista. Similarmente, no teste de Sequencia Comportamental de Saciedade, foi demonstrado que a ativação desses receptores promoveu um retardo no ponto de saciedade, com aumento no consumo alimentar relativo. Além disso, foi observado, assim como a ativação periférica, diminuição do gasto energético induzido pela atividade física. Estes resultados encontram respaldo em algumas evidencias na literatura, e nos sugerem que a ativação dos receptores de glicocorticoides podem estar envolvidos com o balanço energético positivo, promovendo aumento no consumo alimentar, bem como redução no gasto energético [29].

Na análise do consumo alimentar a cada 4 horas, ambos grupos tratados tanto com injeção intraperitoneal como intracerebroventricular de dexametasona apresentaram um padrão de alimentação similar, com ocorrência de pico de alimentação por volta das 10 horas. Esse padrão de ritmicidade no consumo alimentar, está de acordo com o observado em animais controles, onde o pico de alimentação corresponde às primeiras horas do ciclo escuro [30,31]. Os ritmos ao longo do dia na ingestão alimentar refletem diretamente os ritmos dos níveis diários de glicocorticoides. O pico de glicocorticoides ocorre pouco antes do início do ciclo escuro. Este pico, antecipa o de alimentação que ocorre no início do ciclo escuro [32]. No atual estudo,

aumentamos o aporte de glicocorticoides no final do ciclo claro e mensuramos o consumo alimentar a cada 4 horas após o início do ciclo escuro. Em consonância com as relações entre os níveis plasmáticos de glicocorticoides e consumo alimentar, observamos que tanto sob efeito da injeção via intraperitoneal como intracerebroventricular, houve aumento no consumo alimentar nas primeiras de 4 horas do ciclo escuro. Foi demonstrado que injeção intracerebroventricular de dexametasona no ventrículo lateral durante 3 dias promoveu aumento sustentado no consumo alimentar e peso corporal, o que pode ser explicado por uma maior expressão do neuropeptídeo orexigênico NPY no núcleo arqueado (ARC) e a promoção de um estado de resistência a leptina como revelado por um aumento da leptina plasmática [29]. Neste estudo, a mesma dose de dexametasona administrada por via intraperitoneal, não aumentou o consumo alimentar, como observado na injeção intracerebroventricular. Assim, fica evidente que a dexametasona administrada por via intracerebroventricular não teve ação periférica, reforçando que o aumento no consumo alimentar foi resultante da ativação exclusivamente central dos receptores. A falta de um efeito da injeção intraperitoneal da dexametasona observado no estudo acima mencionado contrasta com a indução do consumo alimentar encontrada com a dexametasona por via intraperitoneal em nosso estudo. Tal diferença pode ser atribuída à dosagem. Não é difícil imaginar que uma baixa concentração (5 µg) de dexametasona administrada por via intraperitoneal não seja suficiente (ao contrário do nosso estudo, onde administramos 5 mg/kg) para modificar a homeostase dos neuropeptídeos hipotalâmicos (NPY, AgRP) para aumentar o consumo alimentar. Assim, nós propomos que o consumo alimentar induzido pela injeção intraperitoneal de dexametasona observado em nosso estudo também depende da ação central desse agonista. Apoiando esta ideia, tem sido demonstrado que tanto a administração central aguda (10µg) quanto periférica de glicocorticóides (5mg/kg) é capaz de ativar células hipotalâmicas [20]. Os glicocorticoides, e, portanto, moléculas agonistas de seus receptores, apresentam a capacidade de atingirem o sistema nervoso central e agirem sobre o ARC, onde encontra-se uma grande densidade de seus receptores [33]. Além disso, a regulação da expressão do NPY por glicocorticoides e a ação do NPY contribuindo para o aumento consumo alimentar estão bem estabelecidas [29, 34].

De modo a complementar os resultados do consumo alimentar a cada 4 horas no ciclo escuro, foram realizados o estudo microestrutural do comportamento alimentar, através da Sequência Comportamental de Saciedade. Os animais tratados com injeção intraperitoneal de dexametasona não apresentaram efeitos sobre o consumo alimentar após 1 hora de aplicação do agonista. Ambos grupos, controles e tratados, apresentaram seus pontos de saciedade no período

6, que corresponde a cerca de 30 minutos após a oferta do alimento. Consequentemente, não foi observado nenhuma diferença no tempo de alimentação e de descanso, tampouco no consumo alimentar relativo e taxa de alimentação. Entretanto, na administração intracerebroventricular do agonista, os resultados foram diferentes. Enquanto no grupo controle este ponto esteve presente no período 6, o grupo tratado o apresentou em um ponto que se estendeu além do período 7 correspondendo a cerca de 38 minutos após a oferta da dieta. Isto significa um retardo em 8 minutos (~27%) do ponto de saciedade. Este retardo foi refletido no aumento do tempo de alimentação e diminuição no tempo de descanso, bem como no aumento do consumo alimentar relativo. Esta diferença no ponto de saciedade observado entre os grupos tratados com dexametasona, pode ser devida à via de administração e, portanto, à sua velocidade para atingir o hipotálamo em concentrações suficientes para induzir um efeito. De fato, dexametasona administrada por via intraperitoneal não aumentou o consumo alimentar 1 h após a exposição ao agonista, mas a conseguiu às 4 h, sugerindo que a concentração mínima de glicocorticóides no hipotálamo para observar um efeito é dependente do tempo. Esta hipótese é apoiada por dados na literatura que mostram um aumento da expressão do cFos hipotalâmico, um marcador de atividade neuronal, 2 h após a administração periférica de dexametasona [20]. Diante disto, não descartamos a possibilidade de que se a SCS tivesse sido iniciada algumas horas após a aplicação da droga, os animais provavelmente expressariam alguma modificação em algum dos parâmetros analisados. O consumo alimentar é regulado criticamente no hipotálamo [35] e sabe-se que o ponto de saciedade é atingido quando os níveis dos neuropeptídeos orexigênicos NPY e AgRP são menores do que os níveis dos neuropeptídeos anorexigênicos POMC e CART [36]. Assim, o aumento de consumo alimentar e atraso do ponto de saciedade observado neste estudo pode ser explicada por uma indução da expressão NPY / AgRP pelos glicocorticoides. Apoiando esta ideia, estudos na literatura mostram que a administração intracerebroventricular de agonistas para glicocorticoides promove um aumento na expressão dos genes NPY e AgRP [37]. Além disso, Briski et al., (1997) mostraram que a administração de glicocorticoides no ventrículo lateral (como neste estudo) induz a reatividade cFos no ARC, demonstrando a capacidade dos mesmos em ativar células neste núcleo hipotalâmico, onde NPY e AgRP são sintetizados [20]. Embora não tenhamos medido os níveis de peptídeos hipotalâmicos envolvidos no controle do balanço energético, os dados citados acima fornecem evidências sólidas para sugerir que o atraso do ponto de saciedade e o aumento do consumo alimentar induzido pela dexametasona podem envolver a regulação de neuropeptídeos orexigênicos.

Para determinar se os glicocorticoides regulam gasto energético, os quais, juntamente com o consumo alimentar, determinam o balanço energético, realizamos a análise do gasto energético induzido pela atividade física em um teste de atividade locomotora. Observou-se que os animais tratados com administração intraperitoneal da dexametasona mostrou uma redução no gasto energético assim como uma redução da potência e distância percorrida, bem como aumento do tempo de imobilidade. O Músculo esquelético corresponde a 40-50% da massa corporal e apresenta um importante papel no metabolismo energético, e, portanto, no gasto energético [38]. A dexametasona circulante pode se ligar aos receptores de glicocorticoides amplamente distribuídos entre os tecidos periféricos, incluindo o músculo esquelético [33]. Neste tecido, a estimulação desses receptores diminui a captação de glicose inibindo o recrutamento do transportador GLUT4 (estimulado pela insulina) para a superfície celular [39,40]. Não surpreendentemente, a utilização de antagonistas dos receptores de glicocorticoides, como RU-486, resulta em diminuição na resistência à insulina [41]. Além disso, a ativação dos receptores de glicocorticoides também promove alterações no metabolismo de proteínas do músculo esquelético. De fato, demonstrou-se que a dexametasona aumenta a expressão de MuRF1, uma importante ubiquitina E3 ligase implicada na degradação proteica, presente no músculo esquelético [42]. Os aminoácidos resultantes são transportados para o fígado onde servem como substratos para a gluconeogênese hepática. Assim, sugerimos que a ação dos glicocorticoides no músculo esquelético promova um estado de gasto energético reduzido, explicando a diminuição da distância percorrida, da potência média e do tempo imobilidade. A diminuição do gasto energético foi provavelmente resultante da ação dos glicocorticoides sobre os receptores periféricos, uma vez que no mesmo intervalo de tempo de administração do fármaco, os animais não apresentaram alteração no comportamento alimentar, que é regulado no sistema nervoso central. A administração central da dexametasona também diminuiu o gasto energético. Como o efeito sobre a atividade locomotora se deu 1h após a administração do agonista, assim como observado sobre o comportamento alimentar, sugere que essa redução esteja envolvida com o balanço de peptídeos hipotalâmicos e suas influências sobre os tecidos periféricos. Sabe-se que os peptídeos hipotalâmicos estão ligados ao gasto energético por intermédio da termogênese no tecido adiposo marrom [43]. No entanto, os neurônios de primeira ordem AgRP no ARC apresentam participação ativa sobre a atividade locomotora [44]. E o NPY tem sido relacionado diretamente com a diminuição da atividade locomotora e ao ganho de peso corporal [45]. Assim, o gasto energético diminuído observado no tratamento intracerebroventricular da dexametasona pode ser um efeito do aumento da expressão peptídica orexigénica.

Sabe-se que a dexametasona pode induzir comportamentos como ansiedade e depressão, reduzindo a atividade locomotora que poderia introduzir um fator de confusão na interpretação do gasto energético. Com relação ao comportamento ansioso, a dexametasona é um agonista de um receptor cujo ligante endógeno é considerado o hormônio do estresse. O parâmetro Tempo de permanência na área central, intermediária e periférica permite avaliar os níveis de ansiedade em ratos [26]. Esses animais exibem um comportamento chamado tigmotatismo, que corresponde a andar perto das paredes [27]. O aumento ou diminuição do tempo de permanência na área central do campo aberto indica a redução ou aumento dos níveis de ansiedade, respectivamente [26]. Aqui, observamos que os animais tratados com a dexametasona central e periférica não apresentaram diferenças no tempo de permanência nas três áreas do campo aberto. Isso sugere que a redução no gasto energético observado em nossos animais tratados com a dexametasona não resultou do aumento da ansiedade, o que leva a menor atividade no campo aberto. Além disso, o comportamento ansioso está relacionado com a resposta de luta ou fuga [46]. Esta resposta está ligada a um mecanismo não-genômico dos glicocorticoides, que requer respostas rápidas e transitórias não dependes da expressão gênica [46]. Ferreira e colaboradores (2000) descobriram que 4 h após administração intraperitoneal da dexametasona, não houve redução da ação ansiolítica do etanol. No entanto, 15 minutos após essa administração, houve diminuição da ação ansiolítica do etanol em ratos [47]. Em nosso estudo, o intervalo entre a aplicação do fármaco e o início dos testes experimentais foi suficiente para que essas respostas rápidas fossem perdidas. Em relação ao comportamento depressivo, a exposição à dexametasona deve ser crônica para induzir tal fenótipo [48]. Em linha com isso, Pan e colaboradores demonstraram uma relação entre hiperatividade crônica do eixo HPA e transtornos afetivos recorrentes [49]. Entretanto, em nosso estudo focalizamos a administração aguda da dexametasona. Além disso, a presença de um mal-estar pode ser excluída uma vez que comparado com o veículo, ratos tratados com dexametasona exibem uma resposta idêntica ao se alimentar durante o teste de SCS.

Os dados aqui apresentados mostram que os glicocorticoides aumentam o consumo alimentar e diminuem o gasto energético induzido pela atividade física. Estas mudanças promovem um balanço de energia positivo, o que leva ao ganho de massa corporal. Embora neste estudo não tenhamos medida a variação do peso corporal, devido ao curto tempo de avaliação (12h), sabe-se que os glicocorticoides promovem o ganho de peso corporal [29]. Neste estudo, determinamos apenas um componente do gasto energético (induzido por atividade locomotora), porém não excluimos um efeito dos glicocorticoides sobre a

termogênese induzida por sinalização simpática. De fato, quando administrados por via intracerebroventricular, os glicocorticoides diminuíram a expressão das proteínas termogênicas desacopladoras 1 e 3 (UCP1 e UCP3) no tecido adiposo marrom [29]. Estudos posteriores utilizando calorimetria indireta são necessários para determinar se a termogênese também é reduzida, o que pode contribuir para o balanço energético positivo observado no tratamento com dexametasona.

Em resumo, concluímos que a ativação dos receptores de glicocorticoides promove aumento do consumo alimentar e diminui gasto energético contribuindo para um balanço energético positivo. Assim, a estimulação desses receptores em condições estressantes pode estar envolvida em uma série complexa de mecanismos relacionados à etiologia da obesidade.

Ao testarmos a segunda hipótese proposta, demonstramos que a ativação dos receptores nucleares REV-ERB α centrais promove aumento do consumo alimentar, ganho de massa corporal e da eficiência alimentar, acompanhados por tendência a redução na temperatura retal. A ativação desses receptores também afetou o metabolismo energético, promovendo hiperglicemia sem alterações na sensibilidade à insulina. Juntos, esses resultados mostram que os receptores REV-ERB α centrais podem contribuir para o balanço energético positivo. Além disso, demonstramos que essa ativação não induz ao comportamento ansioso, mas eleva alguns parâmetros da atividade locomotora, e conseqüentemente, do gasto energético induzido pela atividade física. Essa aparente contradição entre aumento da eficiência alimentar e do gasto energético, pode ser explicada pelo status energético do organismo. O teste de eficiência alimentar foi realizado sob condições de jejum de 24 horas, enquanto o campo aberto, para minimizarmos o estresse promovido pelo jejum, os animais estiveram sob condições *ad libitum*. Ao realizarmos o teste de eficiência alimentar em condições *ad libitum*, observamos que a ativação central dos receptores REV-ERB α não alterou consumo alimentar e tendeu a reduzir ganho de massa corporal. Juntos, esses resultados sugerem que os receptores REV-ERB α centrais podem promover um balanço energético diferencial a depender do estado energético do organismo.

A ativação dos receptores REV-ERB α centrais, promoveu aumento do consumo alimentar, ganho de massa e da eficiência alimentar de maneira dose dependente. A dose de 10 μ g do agonista administrado por via intracerebroventricular, foi a que demonstrou maior potencial de influenciar o balanço energético. Quando administrada por via intraperitoneal, esta mesma dose não induziu a esses resultados. Juntos, eles demonstram que o aumento do

consumo e a eficiência alimentar são resultantes da ativação exclusivamente central dos receptores REV-ERB α . Até o momento, nenhum estudo demonstrou a influência do REV-ERB α sobre o consumo alimentar. Em estudo epidemiológico, foi demonstrado que polimorfismos no gene *Rev-erba* leva ao fenótipo de obesidade, entretanto, não foi encontrada relação com o consumo alimentar [17]. Além disso, a ativação periférica desses receptores não altera o consumo alimentar, embora reduzam o peso corporal em ratos obesos [50]. Nosso estudo é o primeiro a demonstrar que a ativação central do REV-ERB α afeta o controle do balanço energético e são capazes de alterar o consumo alimentar. Por ser observação recente, a compreensão de possíveis vias envolvidas nesta ação, são ainda desconhecidas. Tais vias, podem estar ligadas à mecanismos regulatórios associados aos relógios circadianos ou à mecanismos independentes desses relógios [51]. Com relação aos mecanismos ligados aos relógios, sabemos que o REV-ERB α reprime a transcrição do gene *Bmal1*. Juntas, proteína BMAL1 e CLOCK formam um heterodímero, CLOCK;BMAL1, que ativam a expressão de genes portadores do elemento E-box em suas regiões promotoras [52]. Dentre os genes portadores deste elemento, destaca-se o *Cart* [53], que codifica peptídeo hipotalâmico anorexigênico CART. Portanto, a ativação central do REV-ERB α , pode reduzir a expressão do gene *Bmal1* e consequentemente, do *Cart*. Embora nós não tenhamos medido a expressão desses genes, a redução da expressão de ambos, pode explicar o aumento do consumo alimentar e até o aumento da eficiência alimentar observados neste estudo. Com relação a possíveis vias independentes dos relógios que liguem o REV-ERB α com o controle do balanço energético, o mecanismo também é desconhecido. Entretanto, recentemente foi demonstrado que a ativação periférica dos receptores REV-ERB α e β , também promovem modulação de orexinas (peptídeo orexigênico) no hipotálamo, embora não tenha sido objetivo dos autores registrar o consumo alimentar [54].

O aumento do ganho de massa corporal e da eficiência alimentar é indicativo que a ação central do agonista dos receptores REV-ERB α apresenta efeitos sobre o gasto energético. Como análise de termogênese, nós realizamos a aferição da temperatura retal. Esta, consiste em técnica utilizada por vários autores para mensuração da termogênese [55,56], e considerada indicativo de temperatura central [57]. No atual estudo, nós observamos uma tendência a redução da temperatura no intervalo de 3 horas após a administração do agonista. Essa pequena redução na temperatura corporal somado ao aumento do consumo alimentar, é coerente ao aumento do ganho de massa corporal e eficiência alimentar. O hipotálamo é importante local do Sistema Nervoso Central implicado na termorregulação. Sua região parasubventricular

recebe densa quantidade de projeções do Núcleo Supraquiasmático (NSQ), comandando o padrão circadiano da termorregulação [58]. Diante disto, o REV-ERB α pode ter contribuído para a tendência a redução da temperatura retal observada no presente estudo. No tecido adiposo marrom, esse receptor afeta a termogênese modulando a expressão do gene Ucp-1 [59]. Entretanto, sua ação central sobre a termogênese merece ser detalhada com estudos adicionais. Alguns peptídeos hipotalâmicos também participam da termorregulação. O NPY reduz a termogênese [60]. O CART, recentemente, foi apontado como capaz de modular a temperatura no tecido adiposo marrom [61]. Como mencionado, não medimos a expressão do CART, mas uma possível redução na sua expressão, pode produzir, ao menos em parte, a resposta que observamos.

O metabolismo energético também recebe influências da ativação central dos receptores REV-ERB α . Tanto os níveis de insulina quanto os glicêmicos apresentam um padrão circadiano [62]. Isto evidencia que o metabolismo dos carboidratos é passível de regulação circadiana. De fato, camundongos mutantes para o gene clock apresentam hiperglicemia e hipoinsulinemia [14]. No presente estudo, observamos que os animais tratados com o agonista REV-ERB α administrado por via intracerebroventricular, apresentaram redução da tolerância à glicose. Quando administrada por via intraperitoneal, não observamos qualquer alteração nos níveis glicêmicos. Esses resultados mostram que a elevação dos níveis plasmáticos da glicose resulta da ativação exclusivamente central dos receptores REV-ERB α . Nossos resultados são contrastantes aos observados por Solt e colaboradores, que demonstraram redução dos níveis glicêmicos em ratos obesos tratados com agonista dos receptores REV-ERB α por via intraperitoneal [50]. Essa redução pode ser explicada pelo fato que no pâncreas, a ativação desses receptores induz a secreção de insulina [63]. E ainda, o heme reprime a transcrição de genes ligados a gluconeogênese no fígado, como fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose 6 fosfato (G6P) [64]. Entretanto, até o momento, nenhum estudo mostrou as repercussões da ativação dos receptores REV-ERB α centrais sobre o metabolismo energético. Juntos, as diferenças entre nossos resultados e as evidências na literatura, sugerem que o agonista do REV-ERB α possa agir de maneira tecido-dependente. Provavelmente, a redução da tolerância à glicose resultante da ativação central do REV-ERB α possibilite o organismo prover energia ao encéfalo, já que aumenta o consumo alimentar e reduz a absorção de glicose. Os mecanismos subjacentes à essa redução em decorrência a ativação dos receptores REV-ERB α centrais não são claros, entretanto, a repressão do Bmal1 hipotalâmico pode compor esses mecanismos. Camundongos deficientes do gene Bmal1 apresentam redução da secreção de

insulina e hiperglicemia [65]. Além disso, os mecanismos independentes dos relógios também podem estar atuantes. O balanço entre peptídeos hipotalâmicos também pode repercutir na glicemia. A deficiência no POMC, por exemplo, pode resultar em prejudicada tolerância à glicose [66]. Entretanto, o envolvimento do BMAL1 e peptídeos orexigênicos com redução na absorção da glicose induzida pelo REV-ERB α , precisa ser estudado. Em nosso estudo, não observamos que alterações na sensibilidade à insulina em decorrência da ativação central do REV-ERB α . Similarmente, camundongos deficientes no gene *Rev-erba*, também não apresentam alterações nessa sensibilidade [67]. Juntos, esses resultados mostram que a ativação dos receptores REV-ERB α centrais induz a redução na tolerância à glicose, provavelmente, devido a redução da secreção de insulina, sem alterar a sensibilidade a mesma.

Há registros na literatura que apontam o envolvimento dos receptores REV-ERB α com comportamento ansioso [68]. Esse comportamento tende a alterar a exploração do campo aberto influenciando diretamente o gasto energético induzido pela atividade física. Isto nos daria uma falsa interpretação sobre o aumento do ganho de massa corporal observado nos indivíduos tratados com o agonista. De modo a verificarmos se a administração central do agonista REV-ERB α induz à ansiedade ou mal-estar, nós realizamos o teste do campo aberto. Como já mencionado em resultados anteriores, este teste é reconhecido como capaz de detectar os níveis de ansiedade em ratos [26], pelo fato desses animais apresentarem o comportamento de tigmotatismo [27]. Assim, o tempo de permanência nas áreas central, intermediária e periférica do campo aberto, nos fornece indícios dos níveis de ansiedade em ratos [26]. No presente estudo, observamos que a ativação central do REV-ERB α não alterou o tempo de permanência nas áreas central, intermediária e periférica do campo aberto. Isso evidencia que a ativação central dos receptores não altera níveis de ansiedade e nos garante que os resultados de consumo alimentar e atividade locomotora não sofreram interferências por aumento dos níveis de ansiedade ou mal-estar.

Os resultados do campo aberto também nos permitem acessar alguns parâmetros da atividade locomotora. Aqui, nós observamos que o tratamento com o agonista promoveu aumento da atividade locomotora com aumento da potência média, da distância percorrida e da velocidade média. Consequentemente, observamos aumento no gasto de energia induzida pela atividade locomotora. Além disso, estes resultados foram confirmados pelo registro contínuo da atividade dos animais, por intermédio de sensores de movimento. Este, nos possibilitou a quantificação do tempo em que os animais passaram se movimentando. Uma hora após a administração do agonista, observamos aumento do tempo em que os animais permaneceram

em movimento, que foi diminuindo gradativamente até se igualar à resposta dos controles entre 4 e 5 horas após a administração. Esse aumento da atividade locomotora é compatível com outros registros na literatura. Woldt e colaboradores demonstraram que camundongos deficientes de receptores REV-ERB α , apresentam diminuição na capacidade muscular e eficiência da atividade física, bem como redução na função e no conteúdo de mitocôndrias na fibra muscular. Em contrapartida, em cultura de células, a ativação farmacológica desses receptores, aumentou a função e biogênese mitocondrial no tecido muscular, além de melhorar o rendimento da atividade física, chegando a sugerir que a ativação destes receptores pode melhorar o metabolismo oxidativo mitocondrial e a capacidade física [69]. Além disso, Banerjee e colaboradores demonstraram que a administração intraperitoneal do agonista do REV-ERB α induz ao aumento da atividade locomotora e da vigília [68]. No entanto, em nosso estudo, a administração da droga se deu por via intracerebroventricular e, pouco se sabe sobre a conexão entre os receptores REV-ERB α centrais com a atividade locomotora. Nós sugerimos que alterações na expressão dos genes *Bmal1* e peptídeos hipotalâmicos anorexigênicos, possam estar subjacentes a essa conexão. Algumas evidências sustentam essa possibilidade. A presença do gene *Bmal1* em estruturas encefálicas é necessária para a modulação da atividade locomotora na Atividade Antecipatória Alimentar (AAA) em animais sob restrição alimentar [70]. E, o NPY e o AgRP, apresentam influências regulatórias sobre a atividade locomotora [44,45].

Entretanto, é importante ressaltar a contradição ao compararmos nossos resultados de eficiência alimentar, com os de aumento do gasto energético induzido pela atividade locomotora. Essa aparente contradição pode ser explicada por uma diferença metodológica que utilizamos. Para minimizar eventos estressores, o teste de campo aberto foi realizado em ratos sob condições de alimentação *ad libitum*. Já o teste de eficiência alimentar, foi realizado após jejum de 24 horas. Essa diferença metodológica junto aos resultados contraditórios, nos sugere a possibilidade de que o status energético da célula possa influenciar a resposta do receptor REV-ERB α ao seu agonista. Há evidências de que o REV-ERB α apresenta grande participação em mecanismos fisiológicos em resposta à restrição calórica e/ou alimentar. Quando a disponibilidade de alimento é restrita à período de poucas horas por dia, e esse regime é mantido, o animal exibe um conjunto de modificações comportamentais e fisiológicas, horas antes do momento da refeição [71], fenômeno conhecido como Atividade Antecipatória Alimentar – AAA [72]. Uma das características da AAA é o aumento da atividade locomotora [73]. Recentemente, foi demonstrado que camundongos deficientes no gene *Rev-erba* no

encéfalo não apresentam a AAA [74]. Além disso, apresentam um comportamento locomotor fragmentado e arritmico [74]. Esses resultados sustentam a hipótese de que os receptores REV-ERB α possam participar de respostas do organismo à restrição calórica/alimentar. E, evidenciam ainda, que os receptores REV-ERB α centrais podem influenciar a atividade locomotora em indivíduos sob restrição calórica.

Para testarmos essa hipótese, nós realizamos um teste de eficiência alimentar onde foi mensurado o consumo alimentar e ganho de massa corporal e eficiência alimentar no intervalo de 24 horas após administração da droga em animais sob alimentação *ad libitum*. Evidenciamos que a ativação central dos receptores REV-ERB α não alterou o consumo alimentar, induziu tendência a redução no ganho de massa corporal e eficiência alimentar. Confrontando esses resultados com os de atividade locomotora, o esperado seria observarmos uma redução do ganho de massa corporal e da eficiência alimentar. A tendência a redução nesses parâmetros pode resultar de um aumento do gasto de energia transitória. Avaliamos o gasto energético no campo aberto, em uma análise realizada 1 hora após a administração da droga durante um intervalo 5 minutos. Assim, não temos a garantia de que esse gasto energético se manteve elevado após esse intervalo. Além disso, não realizamos medidas de gasto energético por termogênese ou calorimetria indireta no intervalo de 24 horas após a administração do agonista. No entanto, os animais com livre acesso a alimentação apresentaram resultado da eficiência alimentar diferente do obtido nos animais após jejum de 24 horas. Isto nos mostra forte indício de que o receptor REV-ERB α tem sua ação influenciada pelo status energético da célula. A redução da razão NAD(P)H/NAD(P)⁺ aumenta a ação do SIRT1, uma desacetilase NAD⁺ dependente, que influencia a transcrição do BMAL1 e interage fisicamente com a proteína CLOCK suprimindo a atividade do heterodímero CLOCK;BMAL1 [75]. Esse mecanismo interfere na ritmicidade da expressão de alguns genes relógios, incluindo o Rev-erba. Embora pouco conhecidas, as funções dos receptores REV-ERB α incluem a detecção do estado redox [76] e metabólico da célula [77]. Um exemplo foi demonstrado recentemente em ratos alimentados com dieta rica em ferro. Este elemento promove aumento das espécies reativas de oxigênio e redução da razão NAD(P)H/NAD(P)⁺. Este último, ativa o PGC-1 que aumenta a expressão do heme. Este, se liga aos receptores REV-ERB α , considerados heme sensores, inibem a transcrição de genes pertencentes a via de gliconeogênese no fígado. O paradoxo de redução da razão NAD(P)H/NAD(P)⁺ e da gliconeogênese é justificada pelos autores como resultante de vias complexas envolvendo inúmeros componentes [78]. Adicionalmente, o heme

também é um sensor de O_2 , e seus níveis podem regular o metabolismo de glicose no fígado [79].

Tomado todos juntos, os resultados sugerem que a ativação dos receptores REV-ERB α centrais age sobre o controle do balanço energético aumentando consumo alimentar e ganho de massa corporal, além de redução da tolerância à glicose. Como eles contrastam com os resultados obtidos pela ativação dos receptores periféricos, sugerimos que a ação do agonista sobre o balanço energético se dê de maneira tecido-dependente. Além disso, temos a evidência que a função desses receptores também possa sofrer influência do estado energético da célula. Entretanto, estudos precisam ser realizados para a compreensão das funções dos receptores REV-ERB α centrais no controle do balanço energético, bem como as interferências do estado metabólico do organismo.

9. CONCLUSÃO:

Nossos resultados, de uma maneira geral, confirmam que os receptores nucleares de glicocorticoides e REV-ERB α participam do controle do balanço energético, cada um à sua maneira.

Quando ativados, os receptores de glicocorticoides periféricos e centrais promovem aumento do consumo alimentar e redução do gasto energético induzido pela atividade locomotora. Esses resultados nos levam a aceitar nossa hipótese. A ativação dos receptores nucleares periféricos e hipotalâmicos contribuem para o balanço energético positivo, resultante do aumento do consumo alimentar e redução do gasto energética (induzido pela atividade locomotora).

Quanto aos receptores REV-ERB α centrais, quando ativados, observamos aumento do consumo alimentar, ganho de massa corporal e da eficiência alimentar, além de redução da tolerância à glicose e tendência a redução da temperatura corporal. Esses resultados, por si só, nos levariam a rejeitar nossa hipótese, que afirma “A ativação dos receptores nucleares REV-ERB α centrais contribuem para o balanço energético negativo, resultante da diminuição do consumo alimentar e/ou aumento do gasto energético”. A diferença entre os escassos registros na literatura e nossos resultados, podem sugerir que a ativação do REV-ERB α pode apresentar efeitos tecido-dependente. Entretanto, devemos ressaltar que a condição comum imposta aos animais nos testes de eficiência alimentar, tolerância à glicose e temperatura retal, foi o jejum. Ao realizarmos o teste do campo aberto, mantemos os animais sob alimentação *ad libitum* para minimizarmos o estresse, por se tratar de um teste sensível ao mesmo. Neste teste, observamos que a ativação dos receptores REV-ERB α centrais, promoveu aumento do gasto energético induzido pela atividade locomotora. O consumo e a eficiência alimentar nos animais sob alimentação *ad libitum*, não reproduziram os resultados do mesmo teste em animais após jejum de 24 horas. Esses resultados se assemelham à nossa hipótese, e sugerem que os receptores REV-ERB α possam apresentar uma resposta diferente ao seu agonista a depender do estado energético da célula. No entanto, mais estudos são necessários para a compressão destas respostas.

De uma maneira geral, podemos concluir que os receptores REV-ERB α centrais agem sobre o controle do balanço energético. Se a resultante final for o balanço energético negativo ou positivo, dependerá do tecido e/ou do status energético do organismo.

Os resultados que obtivemos da administração central do agonista dos receptores REV-ERB α abriram para novas possibilidades de relações entre esses receptores e o balanço energético. Foi demonstrado que a ativação desses receptores repercute no comportamento alimentar e no gasto energético. Não há registros na literatura de administração central de agonistas do REV-ERB α e seus efeitos sobre o comportamento alimentar, peso corporal, metabolismo energético e atividade locomotora. Fica evidente a originalidade e impacto de nossos resultados, assim como, as perspectivas de estudos para compressão dos mecanismos envolvidos. Além disso, nossos resultados evidenciam um complexo envolvimento entre o REV-ERB α e controle do balanço energético, podendo o receptor apresentar efeitos distintos a depender do tecido (encéfalo ou órgãos periféricos), ou do estado energético do organismo. Assim, surgem as seguintes perspectivas de estudos:

- Avaliar a atividade locomotora (Campo aberto) e gasto energético induzido pela atividade locomotora após administração central do agonista REV-ERB α em animais sob jejum de 24 horas.
- Realizar o registro contínuo do tempo de movimento dos animais, horas antes e após a administração central do agonista REV-ERB α , em animais após jejum de 24 horas.
- Avaliar consumo alimentar em intervalos de 1, 2 e 4 horas após a administração do agonista REV-ERB α em animais sob alimentação *ad libitum*.
- Avaliar a expressão do gene Rev-erba no hipotálamo de animais após jejum de 24 horas e sob alimentação *ad libitum*.
- Avaliar o conteúdo de cFos no hipotálamo, especialmente no núcleo arqueado (ARC), após administração intracerebroventricular do agonista do REV-ERB α .
- Avaliar a expressão de genes-alvo do REV-ERB α , como o Bmal1, após a administração central do agonista do receptor, em animais após jejum de 24 horas e sob alimentação *ad libitum*.
- Avaliação da expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos, como o CART, após a administração central do agonista REV-ERB α , em animais após jejum de 24 horas e sob alimentação *ad libitum*.

REFERÊNCIAS:

- 1- Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(9):1431-7.
- 2- Skotheim B, Larsen BI, Siem H. The World Health Organization and global health. *Tidsskrift for den Norske laegeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*. 2011;131(18):1793-5.
- 3- Fontaine KR, Barofsky I. Obesity and health-related quality of life. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2001;2(3):173-82.
- 4- McCance RA, Widdowson EM. The determinants of growth and form. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1974;185(1078):1-17.
- 5- Dobbing J. The influence of early nutrition on the development and myelination of the brain. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1964.18;159:503-9.
- 6- Gluckman P, Hanson M. Echoes of the past: Evolution, development, health and disease. *Discov Med*. 2004;4(24):401-7.
- 7- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E & Flier JS. Role of leptina in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996;382 250–252.
- 8- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G & Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics*. 1998;155–157.
- 9- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO et al. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*. 1994;371;799–802.
- 10- Shibli-Rahhal, M. Van Beek, J.A. Shlechte, Cushing's syndrme, *Clin. Dermatol*. 2006;24(4) 260-265.
- 11- Ruano EG, Canivell S, Vieira E. REV-ERB ALPHA Polymorphism Is Associated with Obesity in the Spanish Obese Male Population. *PLoS ONE*, 2014;e1040-65.
- 12- Singh A, Petrides JS, Gold PW, Chrousos GP, Deuster PA. Differential hypothalamic-pituitaryadrenal axis reactivity to psychological and physical stress. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(6):1944-8.
- 13- Liu XY, Shi JH, DU WH, Fan YP, Hu XL, Zhang CC, Xu HB, Miao YJ, Zhou HY, Xiang P, Chen FL. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. *Exp Ther Med*. 2011;2(5):977-984.
- 14- Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 2005;308(5724):1043-5.
- 15- Duez H, Staels B. Rev-erb-alpha: an integrator of circadian rhythms and metabolism. *J Appl Physiol*. 2009;107(6):1972-80.

- 16- Goumidi L, Grechez A, Dumont J, Cotel D, Kafatos A, Moreno LA, Molnar D, Moschonis G, Gottrand F, Huybrechts I, Dallongeville J, Amouyel P, Delaunay F, Meirhaeghe A. Impact of REVERB alpha gene polymorphisms on obesity phenotypes in adult and adolescent samples. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(5):666-72.
- 17- Garaulet, M. Smith, C.E, Gomez-Abellan, P. Ordovas-Monta, M. Lee, Y. Parnell, L.D. Arnett, K. Ordovás, J.M. REV-ERB-ALPHA circadian gene variant associates with obesity in two independent populations: Mediterranean and North American. *Mol. Nutr. Food Res*. 2014;58, 821–829.
- 18- Aja S, Bi S, Knipp SB, McFadden JM, Ronnett GV, Kuhajda FP, Moran TH. Intracerebroventricular C75 decreases meal frequency and reduces AgRP gene expression in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291(1):R148-54.
- 19- Casarotto PC, Andreatini R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007;17(11):735-42.
- 20- Briski KP, DiPasquale BM, Gillen E. Induction of immediate-early gene expression in preoptic and hypothalamic neurons by the glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone. *Brain Res*. 1997;768(1-2):185-96.
- 21- Grant D, Yin L, Collins JL, Parks DJ, Orband-Miller LA, Wisely GB, Joshi S, Lazar MA, Willson TM, Zuercher WJ. GSK4112, a small molecule chemical probe for the cell biology of the nuclear heme receptor Rev-erb α . *ACS Chem Biol*. 2010;5(10):925-32.
- 22- Westerterp KR. Physical activity and physical activity induced energy expenditure in humans: measurement, determinants and effects. *Front Physiol*. 2013;26:4-90.
- 23- Aragão R da S, Rodrigues MA, de Barros KM, Silva SR, Toscano AE, de Souza RE, Manhães-deCastro R. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents a reproducibility study. *J Neurosci Methods*. 2011;195(2):216-21.
- 24- Silva KO, Pereira Sda C, Portovedo M, Milanski M, Galindo LC, Guzmán-Quevedo O, Manhães-de-Castro R, Toscano AE. Effects of maternal low-protein diet on parameters of locomotor activity in a rat model of cerebral palsy. *Int J Dev Neurosci*. 2016;52:38 -45.
- 25- Golozoubova V, Strauss F, Malmlof K. Locomotion is the major determinant of sibutramine-induced increased energy expenditure. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006;83(4):517-27
- 26- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003;463(1-3):3-33.
- 27- Kopp, C., Misslin, R., Vogel, E., Rettori, M.C., Delagrangé, P., Guardiola Lemaître, B. Effects of day-length variations on emotional responses toward unfamiliarity in Swiss mice. *Behav. Proc* 1997; 41:151 – 157.
- 28- Le Floch JP, Escuyer P, Baudin E, Baudon D, Perlemuter L. Blood glucose area under the curve. Methodological aspects. *Diabetes Care*. 1990;13(2):172-5.

- 29- Zakrzewska KE, Cusin I, Stricker-Krongrad A, Boss O, Ricquier D, Jeanrenaud B, RohnerJeanrenaud F. Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes*. 1999;48(2):365-70.
- 30- Orozco-Solis R, Matos RJB, Guzman-Quevedo O, Lopes de Souza S, Bihoue A,. Nutritional Programming in the Rat Is Linked to Long-Lasting Changes in Nutrient Sensing and Energy Homeostasis in the Hypothalamus. *PLoS One*. 2010;5(10):e13537.
- 31- Orozco-Solís, R.; Matos, R.J.B, Lopes de Souza, S.; Grit, I.; kaeffer, B.; Manhães de Castro, R.; Bolanos-Jiménes, F. Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35(7):990-1000.
- 32- Sujino M1, Furukawa K, Koinuma S, Fujioka A, Nagano M, Iigo M, Shigeyoshi Y. Differential entrainment of peripheral clocks in the rat by glucocorticoid and feeding. *Endocrinology*. 2012;153(5):2277-86.
- 33- Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*. 1985;117:2505-2511.
- 34- Sainbury A, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Adrenalectomy prevents the obesity syndrome produced by chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats. *Diebetes*. 1997;46(2):209-14.
- 35- Cota D, Proulx K, Seeley RJ. The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2158-68.
- 36- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti generelated protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl AcadSci U S A*. 1998;95(25):15043-8.
- 37- Lee B, Kim SG, Kim J, Choi KY, Lee S, Lee SK, Lee JW. Brain-specific homeobox factor as a target selector for glucocorticoid receptor in energy balance. *Mol Cell Biol*. 2013; 33(14):2650-8.
- 38- Sandri M. Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Lett*. 2010; 584(7):1411-6.
- 39- Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;275(1-2):43-61.
- 40- Weinstein SP, Wilson CM, Pritsker A, Cushman SW. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metabolism*. 1998;47(1):3-6.
- 41- Kusunoki M, Cooney GJ, Hara T, Storlien LH. Amelioration of high-fat feeding-induced insulin resistance in skeletal muscle with the antiglucocorticoid RU486. *Diabetes*. 1995;44(6):718-20.
- 42- Waddell DS, Baehr LM, van den Brandt J, Johnsen SA, Reichardt HM, Furlow JD, Bodine SC. The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 295(4):E785-97.
- 43- Verty AN, Allen AM, Oldfield BJ. The endogenous actions of hypothalamic peptides on brown adipose tissue thermogenesis in the rat. *Endocrinology*. 2010;151(9):4236-46.

- 44- Huang H, Lee SH, Ye C, Lima IS, Oh BC, Lowell BB, Zabolotny JM, Kim YB. ROCK1 in AgRP neurons regulates energy expenditure and locomotor activity in male mice. *Endocrinology*. 2013;154(10):3660-70.
- 45- Lian J, De Santis M, He M, Deng C. Risperidone-induced weight gain and reduced locomotor activity in juvenile female rats: The role of histaminergic and NPY pathways. *Pharmacol Res*. 2015;95-96:20-6.
- 46- Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(9):518-30.
- 47- Ferreira VM, Takahashi RN, Morato GS. Dexamethasone reverses the ethanol-induced anxiolytic effect in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;66(3):585-90.
- 48- Bhatt S, Shukla P, Raval J, Goswami S. Role of Aspirin and Dexamethasone against experimentally induced depression in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016;119(1):10-8.
- 49- Pan Y, Lin W, Wang W, Qi X, Wang D, Tang M. The effects of central pro-and anti-inflammatory immune challenges on depressive-like behavior induced by chronic forced swim stress in rats. *Behav Brain Res*. 2013;247:232-40.
- 50- Solt LA, Wang Y, Banerjee S, Hughes T, Kojetin DJ, Lundasen T, Shin Y, Liu J, Cameron MD, Noel R, Yoo SH, Takahashi JS, Butler AA, Kameneka TM, Burris TP. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonist. *Nature*. 2012;485(7396):62-8.
- 51- Butler AA, Burris TP. Segregation of Clock and Non-Clock regulatory functions of Rev-erb. *Cell Metab*. 2015;22(2):197-8
- 52- Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002 Aug 29;418(6901):935-41.
- 53- Yamada K, Yuan X, Otabe S, Koyanagi A, Koyama W, Makita Z. Sequencing of the putative promoter region of the cocaine- and amphetamine-regulated-transcript gene and identification of polymorphic sites associated with obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26(1):132-6.
- 54- Amador A, Wang Y, Banerjee s, Kameneka TM, Solt LA, Burris TP. Pharmacological and Genetic Modulation of REV-ERB activity and expression. Affects orexigenic gene expression. *PLos One*. 2016;11(3):e0151014.
- 55- Shintani M, Tamura Y, Monden M, Shiomi H. Thyrotropin-releasing hormone induced thermogenesis in Syrian hamsters: site of action and receptor subtype. *Brain Res*. 2005;1039(1-2):22-9.
- 56- Moriya R, Sano H, Umeda T, Ito M, Takahashi Y, Matsuda M, Ishihara A, Kanatani A, Iwaasa H. RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology*. 2006;147(6):2916-22.

- 57- Cattaneo CG, Frank SM, Hesel TW, El-Rahmany HK, Kim LJ, Tran KM. The accuracy and precision of body temperature monitoring methods during regional and general anesthesia. *Anesth Analg*. 2000;90(4):938-45.
- 58- Lu J, Zhang YH, Chou TC, Gaus SE, Elmquist JK, Shiromani P, Saper CB. Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(13):4864–4874.
- 59- Gerhart-Hines Z, Feng D, Emmett MJ, Everett LJ, Loro E, Briggs ER, Bugge A, Hou C, Ferrara C, Seale P, Pryma DA, Khurana TS, Lazar MA. The nuclear receptor Rev-erb α controls circadian thermogenic plasticity. *Nature*. 2013;503(7476):410-3.
- 60- Levine AS, Jewett DC, Cleary JP, Kotz CM, Billington CJ. Our journey with neuropeptide Y: effects on ingestive behaviors and energy expenditure. *Peptides* 2004; 25: 505–510.
- 61- Lau j, Shi YC, Herzog H. Temperature dependence of the control of energy homeostasis requires CART signaling. *Neuropeptides*. 2016;59:97-109.
- 62- Bizot-Espiard JG, Double A, Cousin B, Lesieur D, Guardiola-Lemaitre B, Delagrang P, et al. Lack of melatonin effects on insulin action in normal rats. *Horm Metab Res*. 1998;30(12):711-6.
- 63- Nishiyama K, Hirai K. The melatonin agonist ramelteon induces duration-dependent clock gene expression through cAMP signaling in pancreatic INS-1 β -cells. *PLoS One*. 2014;9(7):e102073.
- 64- Yin L, Wu N, Curtin JC, Qatanani M, Szwegold NR, Reid RA, Waitt GM, Parks DJ, Pearce KH, Wisely GB, Lazar MA. Rev-erb α , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science*. 2007;318(5857):1786-9.
- 65- Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, Lopez JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang X, Takahashi JS, Bass J. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 2010;466(7306):627-31.
- 66- Chhabra KH, Adams JM, Fagel B, Lam DD, Qi N, Rubinstein M, Low MJ. Hypothalamic POMC Deficiency Improves Glucose Tolerance Despite Insulin Resistance by Increasing Glycosuria. *Diabetes*. 2016;65(3):660-72.
- 67- Delezie J, Dumont S, Dardente H, Oudart H, Gréchez-Cassiau A, Klosen P, Teboul M, Delaunay F, Pévet P, Challet E. The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *FASEB J*. 2012;26, 3321–3335.
- 68- Banerjee S, Wang Y, Solt LA, Griffett K, Kazantzis M, Amador A, El-Gendy BM, Huitron-Resendiz S, Roberts AJ, Shin Y, Kamenecka TM, Burris TP. Pharmacological targeting of the mammalian clock regulates sleep architecture and emotional behaviour. *Nat Commun*. 2014;5:5759.

- 69- Woldt E, Sebti Y, Solt LA, Duhem C, Lancel S, Eeckhoutte Matthijs J, Hesselink KC, Paquet C, Delhaye S, Shin Y, Kamenecka TM, Schaart G, Lefebvre Nevière R, Burris TP, Schrauwen P, Staels B, Duez H. Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med*. 2013;19(8): 1039–1046.
- 70- Mieda M, Sakurai T. Bmal1 in the nervous system is essential for normal adaptation os circadian locomotor activity and food intake to periodic feeding. *J Neurosci*. 2011;31(43):15391-6.
- 71- Poulin AM, Timofeeva E. The dynamics of neuronal activation during food anticipation and feeding in the brain of food-entrained rats. *Brain Res*. 2008 Aug 28;1227:128-41.
- 72- Stephan FK. Broken circadian clocks: a clock gene mutation and entrainment by feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(1):R32-3.
- 73- Stephan FK. The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms*. 2002;17(4):284-92.
- 74- Delezie J, Dumont S, Sandu C, Reibel S, Pevet P, Challet E. Rev-erb α in the brain is essential for circadian food entrainment. *Sci Rep*. 2016;6:29386.
- 75- Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*. 2009;324(5927):654-7.
- 76- Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther*. 2006;111(2):327-45.
- 77- Everett LJ, Lazar MA. Nuclear receptor Rev-erb α : up, down, and all around. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(11):586-92.
- 78- Simcox JA, Mitchell TC, Gao Y, Just SF, Cooksey R, Cox J, Ajioka R, Jones D, Lee SH, King D, Huang J, McClain DA. Dietary iron controls circadian hepatic glucose metabolism through heme synthesis. *Diabetes*. 2015;64(4):1108-19.
- 79- Jungermann K, Kietzmann T. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int*. 1997;51(2):402-12.
- 80- Ribeiro, JMG. Caracterização do perfil do ciclo sono e vigília em ratos sob dessincronização forçada. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.

APÊNDICE A – Artigo submetido à Revista Neurobiologia**CAN NUTRIENTS BE ADJUVANTS IN TREATMENT OF DEPRESSIVE DISORDERS? - A LITERATURE REVIEW**

Podem os nutrientes serem adjuvantes no tratamento de afecções depressivas? - Uma revisão da literatura

Tássia Karin Ferreira Borba¹, Tereza Cristina Bomfim de Jesus Deiró², Raul Manhães de Castro³

SUMMARY: The control of humor is regulated by several factor, and nutrition seems to be essential on the maintenance of health and disease. The aim of this review is identify nutrients that influence the control of humor and their association with affective disorders. Synergic or antagonic interactions are analysed beetwen pharmacological substances and ingested nutrients. These interactions can minimize or potentiate the action of affective disorders mediators, such as neurotransmitters. At last, this review brings some research papers about the macro and micronutrients effects. They are precursors or not of neurotransmitters and they interfere on the hormone and neuroimmune response, influencing on the neurotransmission. Thus, the present study analyse the major aspects of adjuvant nutritional therapeutic of affective disorders, depression especially.

KEY WORDS: nutrients, affective disorders, antidepressive agents, food intake

RESUMO: O controle do humor é regulado por diversos fatores, e a nutrição parece ser essencial na manutenção tanto da saúde como na doença. Esta revisão de literatura tem por objetivo identificar nutrientes que exerçam influência sobre o controle do humor e sua associação aos transtornos afetivos. Analisa ainda interações sinérgicas ou antagônicas entre fármacos e nutrientes ingeridos. Tais interações podem minimizar ou potencializar a ação de mediadores de transtornos afetivos, como os neurotransmissores. Por fim, aborda artigos de efeitos de macro e micronutrientes. Estes são precursores ou não de neurotransmissores e interferem na resposta hormonal e neuroimune, influenciando na neurotransmissão. Assim, o presente estudo analisa os principais aspectos da terapêutica nutricional adjuvante nos transtornos afetivos, especialmente a depressão.

PALAVRAS-CHAVE – nutrientes, transtornos afetivos, agentes antidepressivos, ingestão alimentar

Humans grieve or rejoice with ease, due to life events. This experience daily fluctuations in our humor is universal. The mood swings, however, can become excessive in terms of intensity and or duration starts to interfere significantly in the everyday individual. In the regulatory context of controlling mood, Nutrition seems essential factor both in health and in disease.

The Diagnostic Statistical Manual of the American Psychiatric Association, published in 2000 on fourth version (DSM-IV) ¹, classifies affective disorders into two major groups, depressive disorders and bipolar. Among depressive disorders, can be mentioned;

a)The Major Depression - characterized by depressed mood with a duration for six months or more.

b)Dysthymia - characterized by at least two years of depressed mood most of the day, accompanied by depressive symptoms that do not come to characterize a major depressive episode. Its prevalence throughout life is approximately 6%.

c)Occurrence for up to four weeks after birth, also known as postpartum depression - Postpartum Affective Disorder.

d)Seasonal Depressive Disorder - beginning and end of symptoms dependent on certain periods of the year, with the beginning in the winter and ending in spring.

e) Depressive disorders not Specified - include depression that do not meet criteria for major depression or dysthymia, or for adjustment disorders with depressed mood or with mixed symptoms of anxiety and depression.

Bipolar disorders involve compulsory attendance, the patient's history of manic, mixed or hypomanic episodes. Often also major depressive episodes occur. They can be subdivided into Bipolar I and II disorders, cyclothymic, and those not specified. The manic symptoms are

characterized by persistent high expansive, or irritable mood for at least one week and three more of the following symptoms; excessive self-esteem, prolixity, activity increased, ideas, reduced need for sleep, dispersion, involvement in activities without analyzing their risks or consequences leak.

The hypomanic episodes are similar, but the framework is not severe enough to cause significant impairment in social or occupational functioning of the patient. In mixed episodes occur almost daily basis, both as manic symptoms of major depression, with fast alternation between them for a minimum period of one week. Thus, we can conceptualize the subdivisions of bipolar disorders as follows; Bipolar Disorder I - involve one or more manic or mixed episodes generally accompanied by major depressive episodes.

This is a recurrent disorder, whereas 90% of patients exhibit one or more episodes after the first. Yet, there is a familial component, since the first-degree relatives of these patients have a greater likelihood of presenting affective disorders.

Bipolar II disorders - characterized by one or more major depressive episodes accompanied by at least one hypomanic episode. Hypomanic episodes usually occur immediately before or after an episode of major depression. Cyclothymic disorders - is related to the presence of at least two years, several major periods of hypomanic or depressive symptoms. Have chronic and fluctuating course.

Are several, so the subdivisions from mood disorders. In a recent publication (Gonçalves *et al.*, 2014), about the common mental disorders in Brazil, depression and anxiety reported rates above 50% in the populations of the study cities. The mental health problems are particularly high incidence in women, unemployed, in people with low educational level and low income. It is noteworthy, in this particular, the high incidence of depression. In this approach to, attention will be given to the context of major depression, being accounts for about 40% to 60% of cases of hospitalization in psychiatric clinics ².

Major depression is characterized by one or more depressive episodes, with at least two weeks of depressed mood or loss of interest in most activities. The picture is accompanied by at least four additional symptoms of depression. These symptoms that include feelings of hopelessness, worthlessness, guilt, helplessness ³.

Thus, may be present in combination, changes in appetite and sleep, fatigue, psychomotor retardation or agitation, decreased sexual performance, difficulty concentrating and thinking, and recurrent thoughts of death, with or without suicide attempts. The increased irritability is common, especially in children and adolescents. Studies in these life stages, has observed that these depressed individuals have difficulty maturity to solve social problems with cognitive

flexibility deficit differs from adults about the response inhibition deficit or memory ^{4,5}.

Some cases of major depression have special features. Diagnosis involves the onset of loss of interest in most activities or absence of reaction to usually pleasurable stimuli. Furthermore, it should be present at least three more of the following symptoms; depressed mood, perceived different from that observed, morning worsening, insomnia, psychomotor agitation or retardation, anorexia or weight loss and excessive guilt. Generally, there is one or more good and almost complete response prior to biological treatment prior episodes of depression followed by complete recovery or ³.

In this direction, psychotic symptoms may also accompany major depression with the onset of delusions and even hallucinations. Depression with atypical features involves a combination of the following aspects, ability to experience positive response to favorable event, excessive sleeping and eating and exaggerated sensitivity to rejection. Effective pharmacological treatment of depression began in the second half of the 1950s. Only recently have studies begun to advance understanding of the neural bases and pathophysiology of depression and other affective disorders. In reality only with advances of studies on the pharmacodynamics of drugs used as antidepressants is that understanding these foundations began dawning, some hypotheses about the genesis of affective disorders is suggested. Among these hypotheses, can be highlighted; the classic monoamine theory of depression, the hypothesis changes of receptors, and the immune hypothesis ^{3, 6,7}.

There are numerous pharmacological evidence supporting the classic monoamine theory of depression. We emphasize here the discoveries of substances that inhibit the reuptake of biogenic amines norepinephrine and serotonin and other monoamine oxidase inhibitors termed, an enzyme that degrades these monoamines ⁸. The experimental and clinical treatment with these substances increase the brain level of these monoamines and promote antidepressant effect in the subject ⁹. Similar effect, although transient, and exhilarating character, can also be observed in subjects with use of psychostimulants, such as amphetamines, which also promotes increased release of noradrenaline and decrease their neuronal reuptake ¹⁰.

In contrast, reserpine, causing pharmacological depletion of monoamines in the brain in depression promoting about 20% of patients. Together, these observations helped the proposition of the following hypothesis: "Depression is the result of deficiency of monoamine neurotransmission in the brain," especially norepinephrine and / or serotonin. Generally is the classic monoamine theory of depression. Indeed, experimental observations support this hypothesis. For example, a subset of depressed patients have decreased levels of 3-methoxy-4-hydroxy-fenilglicol, a metabolite of norepinephrine appears to reflect that the renewal rate of

noradrenaline ¹¹.

Moreover stands here food substances, precursors of neurotransmitters, such as L-tryptophan and 5-hydroxy tryptophan, which originate serotonin (5-HT) and showed moderate antidepressant action. Lower concentrations of serotonin and its major metabolite, 5-hydroxyindole acetic acid, are found in the brains of suicide victims or the cerebrospinal fluid of depressed individuals. Furthermore, it was demonstrated that acute withdrawal of L-tryptophan induced depression recurrence in 80% of patients successfully treated with substances to selectively block the reuptake of serotonin. Also, administration of alfa-metilparatirosina, an inhibitor of norepinephrine synthesis, promotes acute recurrence of depressive symptoms in patients treated with selective reuptake blockers of neurotransmitter ¹².

In such aspect, this hypothesis suggests even attempts to take up its metabolic profile of depression in the prediction therapeutic response to particular antidepressants. Thus, in the said depressions noradrenergic, also known as inhibited depressions, could indicate more selective inhibition of noradrenaline substances such as reboxetine and nortriptyline, while the serotonergic said depressions, anxious depression, would be advised selective reuptake blockers serotonin, such as fluoxetine and sertraline. Today, this approach seems to be useful in clinical practice, although more studies are needed to confirm it effectively.

Thus, the anatomical substrate for the genesis of depression, appears to reside in the local synthesis pathways and projections of the neurotransmitters norepinephrine and serotonin. These projections originate from nuclei located in the brainstem, cerulean locus and raphe nuclei, respectively. Thus a wide range of innervate forebrain structures such as the cortex, particularly the front; hippocampus; lateral hypothalamus, and other limbic system structures. Experimental and clinical studies have shown that the stimulation of brain areas where these projections are caused by the self-stimulation of animals described as enjoyable sensations and in humans ¹³.

Moreover, these areas are stimulated to promotes such responses, were named of reward areas. Anhedonia is one of the outstanding symptoms of depression, namely, lack of pleasure, is suggested that structures within the reward system that receive noradrenergic and serotonergic projections may be the one responsible for pathophysiology of this anatomical affective disorder substrates ¹⁴.

The complexity of these events which lead to behavioral changes individuals has led and pharmacological studies of food substances that increasing the synthesis or for the reuptake of neurotransmitters within nerve cells can improve various disorders. In this particular, administration of serotonin precursors or lack thereof, can have effects on mood of individuals

resulting in attenuation or increased depressive respectively symptoms¹⁵.

Serotonin has the amino acid tryptophan as a precursor, which is actively transported into the cell via a carrier present in plasma membrane. Once into cell cytoplasm, tryptophan will serve as a substrate for tryptophan hydroxylase, the first enzyme in this pathway, which promotes the conversion of tryptophan to 5-hydroxy-tryptophan¹⁶. The second step in the serotonin synthesis pathway is provided by a decarboxylase enzyme aromatic L-amino acid, converting the product of the first step¹⁶.

Of the pathway, L-5-hydroxytryptophan in serotonin (5-HT)¹⁷. When serotonin is synthesized in the cytoplasm of the cell, it is transported into synaptic vesicles where they are stored until ready to be released into the synaptic cleft in reply to an action potential¹⁷.

Thus the role of tryptophan in the feed of great relevance configures as an amino acid that goes beyond the body composition of proteins but can act in the prevention and treatment of mental disorders. Therefore stands out the consumption of foods containing tryptophan, such as chicken, soy, grains, nuts, tuna, bananas, chickpeas, milk, eggs, cocoa, among others¹⁸, which can result in increased serotonin synthesis reflecting consequently in the mood. Worth remembering the role of vitamin B6 as a cofactor of the enzyme decarboxylase L-aromatic amino acids, which participates in the synthesis of serotonin. Therefore, in addition to food sources in tryptophan, those rich in vitamin B6 can also potentiate serotonin synthesis and enhance intellectual performance in humans^{19,20}.

Study of Cabral Filho et al. (1987) used mice fed rich in carbohydrates and low protein diet supplemented with tryptophan, showed inhibition of seizures, whereas the non-supplemented diet facilitated seizures, suggesting that serotonin levels in the brain can be determined by tryptophan diet or supplementation tryptophan, modulating seizure response²¹.

In addition these foods mentioned above, serotonin synthesis can be influenced by diet composition, as demonstrated in the work of Wurtman and Fernstron, 1975. These authors showed that in some assays protein diets can reduce the concentration of serotonin in the system central nervous while diets high in carbohydrates increase this concentration²². This can be explained by the fact that proteins presenting in their basic amino acids constitution as valine, leucine, methionine, alanine, among others that compete with tryptophan at amino acid transporter present in the blood-brain barrier as a result, have a smaller transport of the amino acid tryptophan to the brain and therefore a decrease in serotonin synthesis. In contrast, a diet rich in carbohydrates increases the concentration of tryptophan in the brain²³.

Aspect to be considered in diet increased carbohydrate intake is insulin release by increased postprandial glucose, which promotes increases in the uptake of these same basic aminoacids

by muscle tissue. This results in reduction of these circulating amino acids and lower chance of competing with tryptophan amino acid transporters in the blood-brain barrier, with consequent increase in its levels in the brain and therefore the synthesis of serotonin ^{22,23}.

In addition, tryptophan is not easily added to the muscle tissue since it is connected to about 75 to 85% to plasma proteins ²⁵. Insulin, in turn, also reduces plasma free fatty acid concentration, reducing the competition for binding sites on plasma proteins with tryptophan resulting in increased efficiency of plasma carriage of tryptophan. Being one of the neurotransmitters serotonin, that when disability may participate in the genesis of depression, source of tryptophan and carbohydrate-rich foods can compose a treatment prescribed by nutritionists to patients with this disorder ²⁶.

Disparity between the time of monoamine reuptake inhibition, which requires hours and the antidepressant effects provided by these substances reuptake inhibitors, requiring weeks demonstrates that the classical theory monoamine becomes insufficient for the genesis of depression. And another more detailed explanation is complementary to monoamine to increase the number or sensitivity of postsynaptic receptors, which corresponds to the hypothesis of changes the receptors²⁷. In this case, the monoamine theory would result from hypersensitivity of the postsynaptic receptors of monoamines, which in a feedback mechanism would decrease the synthesis and release of the aminergic neurotransmitters presynaptic cells ²⁷.

In addition, depression may be the result of hypersensitivity of postsynaptic receptors, characterizing it as arising from the reduction in the synthesis and release of neurotransmitters. The continuous use of monoaminergic substances would have the effect of reducing the density of receptors on postsynaptic cells, and again a feedback regulation would cause an increase in synthesis and release of neurotransmitters. It was observed that with prolonged use of antidepressant substances, a reduction in the levels of cyclic adenosine monophosphate, cyclic AMP second messenger ^{28,29,30}. These evidences open field for more scientific investigations as meaning unravel the etiology of depression.

Addition to the deficiency of monoamines and its alteration in postsynaptic receptor, it is estimated that the genesis of depression may also be involved with the immune system. In 1981 was created the term designating a psychoneuroimmunology interrelationship between nervous, endocrine and immune system. Accordingly, it is suggested that major depression can negatively affect immune function predisposing the individual to the development of other diseases, as well as the immune system can lead to the appearance from depression and other diseases. The brain can communicate with the immune system through neurotransmitters or

activation the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis ³¹.

Furthermore, the immune system and cells can produce substances that can alter the function of neurotransmitters by changing the endocrine function. Among these substances are cytokines responsible for communicating between immune cells and peripheral. Some studies show that the pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF alpha), and interleukins 1, 2 and 6, released during tissue damage have major impact on the neuroendocrine function, altering metabolism of neurotransmitters, modify endocrine function and human behavior. It is believed that cytokines released in immune activation may contribute to the high rate of mood disorder in patients with other diseases. Nesse aspecto foi demonstrado que o stress pré-natal leva a um comportamento semelhante a depressão, com diminuição da IGF-1, e aumento da IL-1 β , TNF- α e a liberação de IFN- γ modificando a expressão de sinalizadores de citocinas com expressão no hipocampo e no córtex frontal de ratos adultos ³².

Thus, behavioral changes by these substances include the appearance of a syndrome called "sick behavior", which is characterized by anhedonia, cognitive dysfunction, anxiety, irritability, psychomotor retardation, fatigue, anorexia, sleep disturbances and increased sensitivity to pain, resembling the classic symptoms of depression. It was identified that depressed patients present a greater amount of interleukin 6 (L6) when compared to patients without depression³¹. Dahl et al. (2014) has shown that the cytokines interleukin (IL) -1 β , receptor antagonist of IL-1 (IL-1ra), IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, colony stimulating factor granulocyte (G-CSF) and interferon gamma (IFN- γ) significantly increased in patients depressed at study entry compared to healthy controls, no significant reduction of seven of the nine cytokines after treatment and simultaneously reducing depressive symptoms ³³.

In addition to the above assumptions, it is now widely known that events in the life of an individual can contribute to the onset of depression. In humans, there is growing evidence that the number of stressful factors, especially psychosocial order, play an important role in the development of affective disorders. It has been found, for example, there is a significant increase in the influence of such events in the three months preceding the start of a depression. Although many people to experience major adverse events during life, few are those who develop affective disorders. Such studies show that depression is directly related to the type of stressful events, such as social nature, financial problems, housing, lack of social support, unemployment, difficulties in interpersonal relationships, and loss of his mother in infancy ³⁴.

These events are accompanied by reduced self-esteem, which would, according to some studies, the main cognitive factor predisposing to the development of depression. A number of studies have demonstrated how impactful can be stressful events in the etiology of depression,

which depressed patients show hyperactivity of the HPA axis ³⁵. Studies attempt to identify which component of this axis was dysregulated in depressed patients.

Yet, the evidence points for the corticotropin releasing hormone (CRH). CRH-producing neurons are located in different regions of the CNS, among which highlight the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN). CRH released by these neurons, neurons act stimulating the pituitary promoting the release of corticotropin (ACTH). This has as target the adrenal glands stimulating the release of glucocorticoids.

It has been demonstrated that depressed patients have increased volume both adrenal glands as the pituitary, which has been attributed to CRH hypersecretion. This, in addition to his duties in the HPA axis may also act on other brain areas as a neurotransmitter. Intracerebroventricular injection of CRH (within a ventricle of the brain) produces behavioral changes such as decreased appetite and libido, and psychomotor impairment of sleep, and anxiety symptoms similar to those presented in depressed subjects ³⁶.

In that particular, studies in laboratory animals suggest that early social deprivation, a risk factor for developing of depression in humans, results in sensitization of CRH-secreting neurons, with marked increases in the expression of the gene ³⁷. In depressed patients mainly those who present the characteristics of "typical" show elevated levels of CRH in the cerebrospinal fluid, which is normalized after treatment with antidepressants ³⁸. This regulation mechanism is not well understood, although it may involve participation of monoaminergic pathways.

Until now, a heterogeneous group of drugs have been used for the treatment of affective disorders, whose mechanisms of action are already understood in the literature. These drugs can be classified;

- tricyclic antidepressants,
- second-generation antidepressants or atypical,
- MAO inhibitors and
- mood stabilizers.

All of them have their pharmacodynamic CNS, specifically in chemical synapses. These are specialized junctions where an axon terminal makes contact with another neuron or other cell type. For their functioning, pre-synaptic neurons all have a neurotransmitter synthesis machinery. Here, we draw attention to the synthesis of amines, such as catecholamines (dopamine, norepinephrine) and serotonin ⁹.

These amines are synthesized from amino acids as precursors, and when ready the cytoplasm of the cell are internalized inside the synaptic vesicles. The amines are released into synaptic

cleft in response to a depolarizing action potential, which diffuse and bind to specific receptors on the plasma membrane of the postsynaptic neuron to exert its biological effects depending on the type of receiver which is bind ^{39,40}. When there is increased at the concentration of neurotransmitters in the synaptic cleft, and when there is need for finalization of neurotransmission, the recapture of amines occurs in the presynaptic neuron. In particular, each has a specific amine recaptador thus for dopamine is the dopamine transporter (DAT) for the norepinephrine transporter norepinephrine (NE) and serotonin, serotonin transporter (SERT) ⁴⁰.

Once inside the presynaptic neuron transmitters recaptured can follow two different routes, are internalized in synaptic vesicles for reuse or undergo enzymatic degradation by the action of monoamine oxidase (MAO), an enzyme found in the outer surface of the outer membrane of mitochondria . The MAO aims to interrupt the activity of amines through degradation of these transmitters. This enzyme is found as two isoforms, MAO A, which is expressed in the brain and the periphery and MAO B is concentrated in the CNS. Both isoforms degrade amines such as dopamine, norepinephrine and serotonin ^{39,40}.

The classical monoaminergic hypothesis infers that substances used in the treatment of depression, same class from different origins and having distinct mechanisms in synapses targets, have a common response by promoting increase in the concentration of neurotransmitters in the synaptic cleft, and this phenomenon responsible the antidepressant effect ⁴¹.

Tricyclic antidepressants, for example, are substances that promote inhibiting reuptake of norepinephrine, serotonin, and dopamine in a lesser degree, in the carriers acting NE, DAT and SERT, respectively. For include the manipulation of 3 neurotransmitter systems, these drugs are used to treat more severe and resistant depression. In addition to blocking the uptake of monoamines transporters, tricyclic antidepressants also have affinity for various postsynaptic receptors, promoting competitive blockade of acetylcholine on muscarinic receptors, alpha adrenergic receptors, norepinephrine, histaminergic of the histamine.

Thus, the discovery of tricyclic antidepressants, along with MAO inhibitors, have promoted a revolution in the treatment of depression, drastically reducing the electroconvulsive treatment ⁴² belonging to the class of antidepressants MAO inhibitors, such as clogirina hydrochloride, act by inhibiting the action of MAO. Consequently, we reduce the degradation of the monoamines which were reuptake, and a larger amount them carried to the interior of synaptic vesicles and thus increase in the amount of these neurotransmitters into the synaptic cleft, responsible for the antidepressant effect ⁴¹.

The first MAO inhibitors, known as first generation, irreversible and nonspecific as to the

inhibition of a particular type of MAO, termed A and B, had limited use for many years because of adverse effects that included hypertensive crisis, cases of hepatic necrosis acute and adverse interactions with other drugs. Years later, this class of antidepressants gained prominence after developing of specific inhibitors for the kinds of MAO and the reversibility of their actions ⁴³.

Substances used in the treatment of depression as Monoamine Oxidase Inhibitors (MAOIs) may interact with nutrients particularly those containing tyramine in its composition. The death of some patients in the 1960s caught the attention of clinicians and researchers to the possibility of interaction between food and medicine ⁴⁴. Tyramine a monoamínico compound derived from the amino acid tyrosine, which is an adrenergic agonist of the an excess from the body may cause hypertensive crises, headache to cerebral hemorrhage. Effects caused by the consumption of foods high in tyramine or its accumulation in the blood, have been described: vasoconstriction, increased cardiac output, increased blood pressure and respiratory rate and increased blood glucose. Visually the symptoms can to be noticed by increasing pupils, salivation and lacrimation ⁴⁵.

The metabolism of tyramine is dependent on the enzymatic action of monoamine oxidase. Thus, individuals who present higher sensitivity to the effects of this biogenic amine or who are making use of any medication known to interfere with the metabolism of monoaminaoxidases enzymes, such as MAO inhibitors, may have worsening of symptoms. These substances act by inhibiting enzymes that degrade amines, in organs such as the brain, kidneys and gastrointestinal tract thereby potentiating the effects caused by this metabolite feed source⁴⁴ can occur.

Interesting is the fact that tyramine be found in a wide list of foods, milk products like cheese in the cheddar and other ⁴⁶. Also, are rich in tyramine other milk products, canned fish, salted and smoked fish, shrimp, caviar, salami, concentrated meat in sauce or broth, and beef liver or poultry, especially if stored for a long time in the form of spreads. The fava bean species, protein supplements, soy sauce and pepper should be consumed in moderation. Between drinks, is red wine, and beer ⁴⁷.

Besides the restriction of tyramine-rich foods, it is recommended to reduce the intake of certain foods stimulants like guarana, coffee, chocolate, mate, etc., by excessive central stimulation that accompanies the use of MAOIs ⁴⁸. Many adverse reactions have been attributed to biogenic amines from the diet. The relationship between tyramine and headaches have been much studied. It has been postulated that patients suffering from migraine food for being sensitive foods with tyramine present MAO dysfunction in the liver and in the blood causing inability to that normally metabolize amine. The tyramine acts on the circulatory system,

causing disturbances in vision, nausea, diarrhea and severe headache. Thus, careful observation of the diet and the knowledge of these facts must be considered, since it can be the cause of health problems difficult to determine etiology ⁴⁹.

Study by Cabral Filho, *et al* (1987) in rats showed that a diet based on corn poor in protein and high in carbohydrates supplemented with tryptophan prevented convulsions; unlike when the diet was not supplemented seizures occurred. These results suggest that the serotonin levels in the brain determined by dietary tryptophan or tryptophan supplementation, can play important result in seizure response ²⁰.

Recent study (Luo *et al.* 2014) demonstrated that hyperammonemia (HA) responsible for hepatic encephalopathy in cirrhotic rats, promoted change in the levels of serotonin (5-HT) contributes to elicit anxiety behavior and cognitive decline. Also in this study, treatment with probiotic *Lactobacillus helveticus*, reduced the metabolism of 5-HT in the cerebellum and hippocampus and the level of inflammatory markers, restoring cognitive function and improvement in anxiety behavior, concluding that probiotics may be potential in the treatment of disorders hepatic encephalopathy associated neurological by regulating the activity of 5-HT observed by the plasma levels of the metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA) and the precursor tryptophan ⁵⁰.

In addition Santos Carvalho *et al.*, (2010) in their study showed reduction in food intake in fed adult rats chronically treated with tryptophan in the neonatal period, demonstrating the involvement of serotonin in modulating of eating behavior ²⁴. Such evidence demonstrate the complexity of these interactions and the role of certain amino acids in the feed as food substrates for treating depression and other neurobehavioral disorders, alone or as adjuvant.

From among the antidepressants reported in the class of those second-generation or atypical stands out the reuptake of serotonin and norepinephrine (SNRIs) and selective inhibitors or serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)⁵¹. Antidepressant reuptake of serotonin and norepinephrine are substances that act by inhibiting the reuptake greater degree of serotonin and norepinephrine, which occurs antidepressant effect by increasing the concentration those neurotransmitters in the synaptic cleft. Furthermore do not present affinity for muscarinic, histaminergic, adrenergic and dopaminergic α . To be more specific than the tricyclic antidepressants and MAOIs, these show relatively minor side effects ⁵².

Increase of production of IL-1 β and TNF- α expression induced convulsive agents was markedly reduced by sertraline. These results indicate that the reduction of inflammatory processes of the brain may contribute to the anti-seizure action sertraline, contributing at low doses to treat depression in epileptic patients. Thus, is demonstrated serotonergic action in

inflammatory processes associated to depression ⁵³.

However, SSRIs are showing a lower incidence and severity of side effects and are therefore the most frequently prescribed class of antidepressants currently. This is due to the fact that SSRIs, such as fluoxetine, are specific, inhibiting the reuptake of serotonin only possibly, been promoting the increase of this neurotransmitter in the synaptic cleft. Also are the most recent in the history of pharmacological treatments of depression, dating its early use in the late 1980s.

Among the side effects of SSRIs is the hypophagia may interfere on the nutritional status of the individual, with particular attention to those to present rapid weight loss due to the depression. Gastrointestinal symptoms are also observed, such as xerostomy, changes in taste and hypoglycemia ⁵⁴. In the latter case, this requires particular attention to diabetic patients. Furthermore, studies show that SSRIs can cause a reduction in the absorption of neutral as methionine, leucine, phenylalanine and tyrosine amino acids up to 30%, and may have anti-nutritional effect in the long term. The paroxetine, another SSRI, is associated with anemia, the recommended iron supplementation ⁵⁵.

Addition to these substances, it is known that the lithium salt is the main representative of the so-called mood stabilizers ⁵⁶. It is effective in the treatment of episodes and the prevention of recurrences of manic or depressive episodes in bipolar patients. Lithium can also be useful in treatment-refractory patients with antidepressants when combined with the latter.

Also other conditions for which treatment with lithium was recommended include certain forms of schizophrenia, alcoholism, emotional lability, aggression and neutropenia however, in these cases, treatment with lithium yet, is not grounded in controlled studies ⁵⁷. Lithium is an alkali metal found in relative abundance in nature. Is present in minute concentrations in the body and has no known physiological role. Their pharmacological effects are numerous, and although hundreds of papers are published every year on lithium, its mechanism of action remains mostly unknown ⁵⁸. The large number of pharmacological effects triggered by lithium greatly complicates an acceptable explanation for their effects to stabilize mood. Several possibilities have been raised, including, possible influences the monoaminergic pathways (dopamine, norepinephrine, epinephrine and serotonin) ^{59,60}.

Substances that facilitate dopaminergic neurotransmission can produce manic symptoms. In laboratory animals, lithium blocks the development of behavioral signs resulting from overactivity of dopamine. Based on this, it was concluded that the antimanic effects of lithium are due to its attenuation dopaminergic ⁶¹ neurotransmission. Chronic administration of lithium produces several changes in serotonergic and noradrenergic similar to those that accompany prolonged treatment with antidepressants systems. By different mechanisms including

increased uptake of the precursor of serotonin, tryptophan, and decreased activity of presynaptic serotonin inhibitory receptors, lithium increases the release of serotonin, particularly in the hippocampus⁵⁹ also increasing by human, the neuroendocrine response to serotonergic agonists⁶².

Although the effects on monoamines may be related to the effects of depression, mania and bipolar patients, and in the case of serotonin and norepinephrine potentiation of the therapeutic effect in depressed patients, they do not explain the humor stabilization, i.e., the effect prophylactic in new crises when there continued in bipolar patients use⁶³. Several alternatives have been proposed in this direction, particularly involving the interaction of lithium with second messenger systems. Lithium inhibits increased levels of adenylate cyclase and cyclic AMP levels and changes of phosphatidylinositol, of all second messengers⁶⁴. In this respect it is worth mentioning the role of antidiuretic hormone in diminish renal elimination of water by increasing the permeability of the collecting tubules. This effect is mediated by the increased levels of cyclic AMP, and polyuria observed in patients treated with lithium should result in the inhibition of cyclic AMP⁶⁴.

In addition to the therapeutic purposes, up to 75% of patients treated with lithium may exhibit some kind of adverse effect. Most of these are small severity, improving by lowering the dose or changing the dosing schedule. Occurs weight gain, gastrointestinal disorders such as nausea, vomiting, diarrhea, and cognitive problems, such as difficulties with concentration and memory.

Lithium is generally presented in the form of lithium carbonate, to be administered orally and is rapidly absorbed by the digestive tract and its excretion is greater performed by the kidneys, which it competes with sodium reabsorption in the renal tubules. At low concentrations of sodium in the body, the reabsorption of lithium is enhanced by the renal tubules resulting in elevated plasma levels, hence recommendation of not restricting sodium intake. Lithium is also present in some food such as grains and vegetables, depending on the concentration of this mineral soil and is also found in bovine animals, meat and eggs in mineral water⁶⁵.

Clinical studies have shown that patients with major depression have lower plasma concentrations and erythrocyte folate and that this fact can be associated with a poor response to treatment with antidepressants. Studies have also shown that supplementation with folic acid in depressed patients can improve the therapeutic effect of antidepressant drugs, such as fluoxetine once patients with depression may present a functional deficiency of folate and the severity of the deficiency indicated by high levels of homocysteine have been correlated with severity of depression. Fluoxetine and folic acid altered lymphocyte function in depression

probably indirectly by reducing levels of homocysteine and directly on lymphocytes, modifying the serotonergic system ⁶⁶.

Studies have shown that folate performs several functions in the organism participates in the biosynthesis of nucleotides, increases the biosynthesis of tetrahydrobiopterin, which is a coenzyme for the hydroxylation of phenylalanine and tryptophan biosynthesis of dopamine, noradrenaline and serotonin, prevents neural tube defects, possibly exerts a neuroprotective role in CNS damage by promoting neuronal growth and repair ^{67,68,69}.

Folic acid is a vitamin B complex which acts as a coenzyme in the metabolism of one-carbon compounds. Folate is a general term used for this group of compounds. Folate is synthesized by microorganisms and higher plants but not mammals, for which an essential nutrient that needed to be ingested from food. Folic acid for the human body is available through diet foods with this vitamin or through tablets or fortified foods. Foods such as beans, peas, spinach, broccoli, asparagus, citrus fruits, grains, milk, meat, liver and raw vegetables have folate, but the desired amount can not be achieved through diet alone ⁷⁰.

Furthermore, low levels of folate are associated with a poor response to treatment with antidepressants and folate participates in the synthesis of serotonin and noradrenaline, neurotransmitters involved in the pathophysiology of depression ⁷¹. Other studies demonstrate the relation of folic acid with major depression, and some evidence indicates also to its participation in the pathophysiology of mania ⁷².

In fact, has been shown that manic patients have significantly lower levels of folate in erythrocytes, indicating that folate deficiency may be involved in this disease. Added to this, a clinical study showed that supplementation with folic acid increases the prophylactic effect of lithium in reducing affective comorbidities. Case report of a patient with mixed disorder of depression and mania that had vitamin B12 and folate deficiency showed complete remission of symptoms after supplementation of these vitamins ⁷³.

It is also known that folic acid is an essential vitamin with several clinical studies that demonstrate your involvement with mood disorders such as major depression and bipolar disorder, and that supplementation with this vitamin enables the improvement of these clinical conditions. The use of preparations of folate forms of folic acid, folinic acid, and l-methylfolate, showed increasing effective antidepressant response at normal and patients with folate deficiency. Recent studies using l-methylfolate, active and more bioavailable folate, is promising way in adjunctive depressive events ⁷⁴.

Thus, it is relevant investigate the involvement of folic acid in the treatment of depression in experimental models as well as their relationship to the pathophysiology of this disease. In

this sense, a preclinical study conducted in 2008, examined the therapeutic effects of folic acid on intracerebroventricular and oral administration in animal models of depression ⁷⁵.

This study concluded that folic acid, regardless of the route of administration, showed antidepressant effect and that its therapeutic effects result from changes in the serotonergic neurotransmission, glutamatergic and noradrenergic systems, probably increasing their synthesis. However, more studies are needed to understand the mechanisms of action.

In a recent study, another vitamin has undergone testing in animal models for depression. It is vitamin E, which when orally administered intracerebroventricularly in rats and depressive characters showed antidepressant effect and potentiated the antidepressant effect of conventional drugs. These results suggest that the inclusion of foods rich in vitamin E, such as oats, nuts, peanuts, sunflower seed, corn, among others, may have a therapeutic action in the treatment of affective ⁷⁶.

In recent research (Zahedi *et al.*, 2014) made with more than 13 000 children and adolescents Iranian shown that feeding high-carbohydrate and energy (junk foods), deficient in nutrients (fast foods, sugary drinks, snacks and snack foods), often with significantly increased odds of psychological distress (depression, anxiety, insomnia, violent behavior). This reinforces the hypothesis of the relationship or interaction. The study infers that improving eating habits toward healthier diets may be an effective approach to improve mental health ⁷⁷.

Conclusion

The present review evidences the impact of certain foods on behavior and mood of individuals. Here we highlight the notion of the functional foods include any food, natural or by man made, containing one or more substances classified as nutrients or non-nutrients, capable of acting in metabolism and human physiology, promoting beneficial health effects. The influence of such foods on the CNS as well as its shortcomings has been the subject of many studies, is still insufficient. Studies suggest that previously known serotonin levels are the result of the quality of a meal, when it comes to food rich in protein and carbohydrates, as well as endowed with micronutrients such as vitamins, which act as cofactors in the synthesis of neurotransmitters. Being a major serotonin neurotransmitters involved in the regulation of mood and behavior including food, knowledge of potentiation synthesis from the food composition is an important therapeutic tool to be indicated by nutritionists professional for the treatment of depression and other disorders affective and behavioral. In this sense, food and dietary guidance should be more comprehensive view of important and careful physiological

aspects regarding the effects of nutrients that may act by increasing the synthesis or enzyme inhibition, promoting increased availability of some neurotransmitters, much less for those patients who already use pharmacological therapies. Added to these features the possibility of these nutrients interact with the pharmacokinetics and pharmacodynamics of some drugs and result in undesirable responses.

Referências;

1. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV-TR)*, 4th edition, text revised. Washington, DC, American Psychiatric Association, 2000.
2. Gonçalves, D.A.; Mari, J.J.; Bower, P.; Gaski, L.; Dowrick, C.; Tófoli, L.F.; Campos, M.; Protugal, F.B.; Ballester, D.; Fortes, S. Estudo multicêntrico brasileiro sobre transtornos mentais comuns na atenção primária: prevalência e fatores sociodemográficos relacionados. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 30(3):623-632, mar, 2014.
3. Ansseau, M, Cerfontaine, J.L, von Frenckell, R, Charles, G, Papart, P, Franck G. *The Newcastle Index for the diagnosis of endogenous depression. Comparison with the Research Diagnostic Criteria for major depression*]. *Encephale*. 13(2):67-72. 1987.
4. Im-Bolter, N, Cohen, N.J, Farnia, F.I. *I thought we were good: social cognition, figurative language, and adolescent psychopathology*. *J Child Psychol Psychiatry*. 54(7):724-32. 2013.
5. Ornstein, T.J, Arnold, P, Manassis, K, Mendlowitz, S, Schachar, R. *Neuropsychological performance in childhood OCD: a preliminary study*. *Depress Anxiety*. 27(4):372-80, 2010
6. Massart, R, Mongeau, R, Lanfumey, L. *Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 5;367(1601):2485-94, 2012.
7. Walker, F.R. *A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake inhibitors: do these drugs possess anti-inflammatory properties and how relevant is this in the treatment of depression?*. *j.neuropharm*. 67:304-17, 2012
8. Lingjaerd, O. *Biochemistry of Depression. A survey of monoaminergic, neuroendocrinological and biorythmic disturbances in endogenous depression*. *Acta Psychiatry*, 302:36-51, 1983.
9. Feighner, J.P. *Mechanisms of antidepressant medications*. *J. Clin Psychiatry*, 60 (4):4-11, 1999.
10. Hoffman B.J, Hansson S.R, Mezey E, Palkovits M. *Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system*. *Front Neuroendocrinol*. Jul;19(3):187-231, 1998.
11. Seiden, L.S. *Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 33:639-677, 1993.
12. Corona, G, Cucchi, M, Frattini, P. Santagostino, G. Schinelli, S. Comincioli, V. Zerbi, F. Fenoglio, L. Savoldi, F. *Amitriptyline and Nortriptyline Plasma Levels, Urinary 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol and Clinical Response in Depressed Women*. *Neuropsychobiology*, 16:97-102, 1986.

13. Neisewander J.L, et al. *Behavioral and neurochemical effects of chronic administration of reserpine and SKF-38393 in rats. J Pharmacol Exp Ther.* 257(2):850–860, 1991.
14. Van Wolfswinkel L, Van Ree J.M. *Hippocampus modulates self stimulation reward from the ventral tegmental area in the rat. Brain Res.* Nov 19;322(1):162-6, 1984.
15. Calib, S., Puglisi-Allegra, S. *stress, depression and the mesolimbic system. psychopharmacology* 128:331-342.1996.
16. Van Praagh, Leijnse B. *The significance of monoamine oxidase inhibition as an antidepressive principle. ii]. Psychopharmacologia.* Apr 16;4:91-102, 1963.
17. Lovenberg, W., E. Jequier and A. Sjoerdsma. *Rapid analysis of tryptophan hydroxylase in rat tissue using 5-³H-tryptophan. Advan. Pharmacol.* 6A: 21, 1968.
18. Hulsken, S. Antje Martin, A, Mohajeri, M. H., Homberg, J. R. *Food-derived serotonergic modulators: effects on mood and cognition. Nutrition Research Reviews:* 26, 223–234, 2013.
19. Lovenbeeg, W., Weissbach, H. & Udenfriend, S. *Aromatic L-amino acid decarboxylase. J. biol. Chem.* 237, 89-93, 1962.
20. Van der Beek, E.J, Van Dokkum, W, Schrijver, J, Wedel, M, Gaillard, A.W, Wesstra, A, van de Weerd, H, Hermus, R.J. *Thiamin, riboflavin, and vitamins B-6 and C: impact of combined restricted intake on functional performance in man. Am J Clin Nutr.* 48(6):1451-62, 1988.
21. Cabral-Filho J.E, Castro R.M, Teodósio N.R, Barreira A.M, Alécio-de-Oliveira E.J. *Does dietary tryptophan play a role in the control of convulsive activity? Braz J Med Biol Res.* 20(3-4):457-9, 1987.
22. Wurtman, R.J; Fernstrom, J.D. *Control of brain monoamine synthesis by diet and plasma amino acids. The american journal of clinical nutrition.* pp. 638-647. 28 june, 1975.
23. Fernstrom, J.D, Wurtman, R.J. *Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. Science,* 178:414 – 6, 1972.
24. Carvalho-Santos, J, Queirós-Santos, A, Morais, G,L, Santana, L,H,S, Brito, M,G, Araújo ,R,C,S, Manhães-de-Castro, R, Deiró, T,C,B, Barreto-Medeiros,J,M. *Efeito do tratamento com triptofano sobre parâmetros do comportamento alimentar em ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal. Rev. Nutr., Campinas,* 23(4):503-511, jul./ago., 2010
25. Knott, P.J, Curzon, G. *Free tryptophan in plasma and brain tryptophan metabolism. Nature.* Oct 20;239(5373):452-3,1972
26. Madras, B.K, Cohen, E.L, Fernstrom, J.D, Larin, F, Munro, H.N, Wurtman, R.J. *Letter: Dietary carbohydrate increases brain tryptophan and decreases free plasma tryptophan. Nature.* Jul 6;244(5410):34-5,1973
27. Kahn, R.S, Asnis, G.M, Wetzler, S, van Praag, H.M. *Neuroendocrine evidence for serotonin receptor hypersensitivity in panic disorder. Psychopharmacology (Berl)* 96(3):360-4,1988.

28. Nibuya, M, Nestler, E.J, Duman, R.S, *Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus*, *J. Neurosci.* 16: 2365–2372,1996
29. Popoli, M, Brunello, N, Perez, J, Racagni G, *Second messenger-regulated protein kinases in the brain: their functional role and the action of antidepressant drugs*, *J. Neurochem.* 74: 21–33,2000.
30. Liebenberg, N. Müller, H.K, Fischer, C.W, Harvey BH, Brink CB, Elfving B, Wegener G. *An inhibitor of cAMP-dependent protein kinase induces behavioural and neurological antidepressant-like effects in rats*. *Neurosci Lett.* Jul 8;498(2):158-61,2011
31. Schuld, A, Schmid, D,A, Haack, M, Holsboer, F, Friess, E, Pollmächer, T. *Hypothalamo-pituitary-adrenal function in patients with depressive disorders is correlated with baseline cytokine levels, but not cytokine responses to hydrocortisone* *Journal of Psychiatric Research* 37:463-470,2003
32. Szczesny, E, Basta-Kaim, A, Slusarczyk, J, Trojan, E, Glombik, K, Regulska, M, Leskiewicz, M, Budziszewska, B, Kubera, M, Lason, W. *The impact of prenatal stress on insulin-like growth factor-1 and pro-inflammatory cytokine expression in the brains of adult male rats: The possible role of suppressors of cytokine signaling proteins.*
33. Dahl, J, Ormstad, H, Aass, H.C, Malt, U,F, Bendz, L.T, Sandvik, L , Brundin L, Andreassen, O.A .*The plasma levels of various cytokines are increased during ongoing depression and are reduced to normal levels after recovery.* *Psychoneuroendocrinology.* 45:77-86, 2014.
34. Post, R.M. *Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of current affective disorder.* *Am J Psychiatry.* 149:999-1010,1992.
35. Nemeroff, C,B. *The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions.* *Mol Psychiatry* 1: 336–342,1996.
36. Krahn, D.D, Gosnell, B.A, Majchrzak, M,J. *The anorectic effects of CRH and restraint stress decrease with repeated exposures.* *Biol Psychiatry.* May 15;27(10):1094-102, 1990.
37. Newport D.J, Stowe Z.N, Nemeroff C.B. *Parental depression: animal models of an adverse life event.* *Am J Psychiatry* 159:1265–1283,2002.
38. Reul, J.M.H.M, Labeur, M.S, Grigoriadis, D.E, DeSouza, E.B, Holsboer F. *Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis changes in the rat after long-term treatment with the reversible monoamine oxidase-A inhibitor moclobemide.* *Neuroendocrinology* 60:509–19,1994.
39. Schoepp, D.D, Azzaro, A.J. *Specificity of endogenous substrates for types A and B monoamine oxidase in rat striatum.* *J Neurochem.* Jun;36(6):2025-31, 1981.
40. Guimarães, J.T, Vindis, C, Soares-da-Silva, P, Parini, A. *Differential substrate specificity of monoamine oxidase in the rat heart and renal cortex.* *Life Sci.* Jul 11;73(8):955-67,2003.
41. Feighner, J.P. *Mechanisms of antidepressant medications.* *J. Clin Psychiatry,* 60 (4)4-11, 1999.

- 42.Freyhan, F.A. *On modern psychiatric therapy of depression.* *Nervenarzt.* Mar 20;31:112-8,1960.
- 43.Murphy, D.L, Lipper, S, Slater, S, Shiling, D. *Selectivity of clorgyline and pargyline as inhibitors of monoamine oxidases A and B in vivo in man.* *Psychopharmacology (Berl).* Apr 11;62(2):129-32,1972.
- 44.Blackwell, B, Marley, E, Price J, Taylor, D. *Hypertensive interactions between monoamine oxidase inhibitors and foodstuffs.* *Br J Psychiatry.* 1967 Apr;113(497):349-65,1967.
- 45.Brodde, O.E. *Influence of adrenoceptor and muscarinic receptor blockade on the cardiovascular effects of exogenous noradrenaline and of endogenous noradrenaline released by infused tyramine.* *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355, 239–24,1997.
- 46.Kayaalp, S.O, Renda, N, Kaymakcalan, S, Ozer A. *Tyramine content of some cheeses.* *Toxicol Appl Pharmacol.* Mar;16(2):459-60,1970.
- 47.Walker, S.E, Shulman, K.I, Tailor, S.A, Gardner, D. *Tyramine content of previously restricted foods in monoamine oxidase inhibitor diets.* *J Clin Psychopharmacol.* Oct;16(5):383-8,1996.
- 48.Marley, E, Blackwell, B. *Interactions of monoamine oxidase inhibitors, amines, and foodstuffs.* *Adv Pharmacol Chemother.* 8:185-349,1970.
- 49.Merikangas, K.R, Stevens, D.E, Merikangas, J.R, Katz C.B, Glover, V, Cooper T, Sandler, M. *Tyramine conjugation deficit in migraine, tension-type headache, and depression.* *Biol Psychiatry.* Dec 1;38(11):730-6,1995.
- 50.Luo J, Wang T, Liang S, Hu X, Li W, Jin F. *Ingestion of Lactobacillus strain reduces anxiety and improves cognitive function in the hyperammonemia rat.* *Sci China Life Sci.* Mar;57(3):327-35, 2014.
- 51.Horst, W.D, Preskorn, S.H. *Mechanism of action and clinical characteristics of three atypical antidepressants: venlafaxine, nefazodone, bupropion.* *J Affective Disord* 51: 237-54,1998.
- 52.Blackwell, B. *Adverse effects of antidepressant drugs. Part 2: 'Second generation' antidepressants and rational decision making in antidepressant therapy.* *Drugs.* Apr;21(4):273-82.1981.
- 53.Sitges, M, Gómez, C.D, Aldana, B.I. *Sertraline Reduces IL-1 β and TNF- α mRNA Expression and Overcomes Their Rise Induced by Seizures in the Rat Hippocampus.* *PLoS One.* Nov 3;9(11):e111665, 2014.
- 54.Boyd, L.D, Dwyer, J.T, Papas, A. *Nutritional implications of xerostomia and rampant caries caused by serotonin reuptake inhibitors: a case study.* *Nutr Rev.* Oct;55(10):362-8,1997.
- 55.Urdaneta, E, Idoate, I., Larralde, J. *Drug nutrient interaction: inhibition of amino acid absorption by fluoxetine.* *Br J Nutr* 79(5):439-446, 1998.
- 56.Cade, J.F.J. *Lithium salt in the treatment of psychotic excitement.* *Med J Aust* 2:349-52,1949.

57.Schou, M, Juel-Nielsen, N, Stromgren, E, Voldby H. *The treatment of manic psychoses by the administration of lithium salts. J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 17(4):250-60,1954.

58.Waldmeier, P.C. *Mechanisms of action of lithium in affective disorders: a status report. Pharmacol Toxicol.* 66 Suppl 3:121-32.1990.

59.Dilsaver, S.C. *Lithium's effects on muscarinic receptor binding parameters: a relationship to therapeutic efficacy? Biol Psychiatry.* Nov;19(11):1551-65,1984.

60.Price, L.H, Charney, D.S, Delgado, P.L, Heninger, G.R. *Lithium and serotonin function: implications for the serotonin hypothesis of depression. Psychopharmacology (Berl)* 100(1):3-12,1990.

61.Basselin, M, Chang, L, Bell, J, Rapoport, S.I. *Chronic lithium chloride administration to unanesthetized rats attenuates brain dopamine D2-like receptor initiated signaling via arachidonic acid. Neuropsychopharmacology* 30:1064–1075,2005.

62.Mandell, A.J, Knapp, S. *Lithium-induced changes in serotonergic mechanisms its potential relevance to the treatment of some addictive disorders. Psychopharmacol Bull.* Jul;11(3):33-4,1975.

63.Souza, F.G, Goodwin, G.M. *Lithium treatment and prophylaxis in unipolar depression: a meta-analysis. Br J Psychiatry.* May;158:666-75,1991.

64.Risby, E.D, Hsiao, J.K, Manji, H.K, Bitran, J, Moses, F, Zhou, D.F, Potter, W.Z. *The mechanisms of action of lithium. II. Effects on adenylate cyclase activity and beta-adrenergic receptor binding in normal subjects. Arch Gen Psychiatry.* Jun;48(6):513-24,1991.

65.Schrauzer, G.N. *Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. J Am Coll Nutr.* Feb;21(1):14-21,2002.

66.Resler, G, Lavie, R, Campos, J, Mata, S, Urbina, M, García, A, Apitz, R, Lima, L. *Effect of folic acid combined with fluoxetine in patients with major depression on plasma homocysteine and vitamin B12, and serotonin levels in lymphocytes.Neuroimmunomodulation.* 15(3):145-52, 2008.

67.Iskandar, B.J., Nelson, A., Resnick, D., Pate Skene, J.H., Gao, P., Johnson, C., Cook, T.D., Hariharan, N. *Folic acid supplementation enhances repair of the adult central nervous system. Ann #eurol.,* 56, 221-227, 2004.

68.Coppen, A., Swade, C., Jones, S.A., Armstrong, R., Blair, J.A., Leeming, R.J. *Depression and tetrahydrobiopterin: the folate connection. J Affect Disord.,* 16, 103-107, 1989.

69.Hall, C.A. *Function of vitamin B12 in the central nervous system as revealed by congenital defects. Am J Hematol.* Jun;34(2):121-7,1990.

70.Krishnaswamy, K., Madhavan, Nair. K. *Importance of folate in human nutrition. Br J Nutr.,* 85 Suppl 2:S115-24, 2001

71.Abou-Saleh, M.T, Coppen, A.
The biology of folate in depression: implications for nutritional hypotheses of the psychoses. J Psychiatr Res. 20(2):91-101,1986.

72.Permoda-Osip, A, Dorszewska, J, Skibinska, M, Chlopocka-Wozniak M, Rybakowski J.K. *Hyperhomocysteinemia in bipolar depression: clinical and biochemical correlates. Neuropsychobiology.* 68(4):193-6,2013.

73.Fafouti, M., Paparrigopoulos, T., Liappas, J., Mantouvalos, V. Typaldou, R., Christodoulou, G. *Mood disorder with mixed features due to vitaminB(12) and folate deficiency. Gen Hosp Psychiatry,* 24, 106-109, 2002.

74.Owen, R.T. *Folate augmentation of antidepressant response. Drugs Today.* 49(12):791-8, 2013.

75.Brocado, P. S.; Rodrigues, A. L. S. Efeitos do ácido fólico em modelos animais de depressão e de mania. xv, 116 f.| il., grafs, 2008.

76.Rodrigues, A. L. S.; Manosso, L. M. Avaliação do efeito da vitamina e em modelo animal de comportamento depressivo induzido por TNF-a. 140 p.| il., grafs., tabs, 2013.

77.Zahedi, H, Kelishadi, R, Heshmat, R, Motlagh, M,E, Ranjbar, S,H, Ardalan, G, Payab, M, Chinian, M, Asayesh, H, Larijani, B, Qorbani, M. *Association between junk food consumption and mental health in a national sample of Iranian children andadolescents: The CASPIAN-IV study. Nutrition.* 30(11-12):1391-7. 2014.

APÊNDICE B – Artigo publicado na Revista Neurobiologia**PODE A NUTRIÇÃO RELACIONAR-SE COM A GÊNESE E TERAPÉUTICA DAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS – UMA REVISÃO DA LITERATURA**

Tássia Karin Ferreira Borba¹, Ana Elisa Toscano Menezes da Silva Castro², Omar Guzmán Quevedo³, Raul Manhães de Castro⁴

RESUMO: Ao modo de um largo espectro de patologias, as Doenças Neurodegenerativas (DNs) apresentam uma ampla interligação com a nutrição, estando esta, envolvida na sua profilaxia, etiologia e terapêutica. Os recursos terapêuticos desenvolvidos até o presente momento, possibilita apenas a minimização de sintomas, pouco sendo efetivo no retardo ou recomposição das bases fisiológicas subjacente à doença. Diante desta escassez de ferramentas capazes de prevenir e tratar tais doenças, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estudos visando compreender suas fisiopatogenias. Abre-se, portanto, para a possibilidade de que a qualidade do alimento possa influenciar na neurodegeneração e também possam ser utilizadas tanto na profilaxia e terapêutica. Publicações recentes vem confirmando os impactos nutricionais sobre a fisiopatogenia das DNs, como os alimentos ricos em carboidratos e glutamato monossódico, bem como os potencialmente terapêuticos, o Curry, a vitamina D e E, além de suas interações com tratamentos farmacológicos, como os alimentos ricos em proteína e o medicamento levodopa.

PALAVRAS – CHAVE: Doenças Neurodegenerativas; Nutrientes; Ingestão Alimentar; Agentes Terapêuticos

¹ Doutoranda do Programa de pós-graduação Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento – Universidade Federal de Pernambuco

² Doutora e professora do Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco

³ Doutor vinculado ao laboratório “Energy Balance and Obesity” NeuroCentre Magendie, INSREM U862, Université Bordeaux 2

⁴ Doutor e Professor do Departamento de Nutrição – Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO: Ao modo de um largo espectro de patologias, as Doenças Neurodegenerativas (DNs) apresentam uma ampla interligação com a nutrição, estando esta, envolvida na sua profilaxia, etiologia e terapêutica. Os recursos terapêuticos desenvolvidos até o presente momento, possibilita apenas a minimização de sintomas, pouco sendo efetivo no retardo ou recomposição das bases fisiológicas subjacente à doença. Diante desta escassez de ferramentas capazes de prevenir e tratar tais doenças, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estudos visando compreender suas fisiopatogenias. Abre-se, portanto, para a possibilidade de que a qualidade do alimento possa influenciar na neurodegeneração e também possam ser utilizadas tanto na profilaxia e terapêutica. Publicações recentes vem confirmando os impactos nutricionais sobre a fisiopatogenia das DNs, como os alimentos ricos em carboidratos e glutamato monossódico, bem como os potencialmente terapêuticos, o Curry, a vitamina D e E, além de suas interações com tratamentos farmacológicos, como os alimentos ricos em proteína e o medicamento levodopa.

PALAVRAS – CHAVE: Doenças Neurodegenerativas; Nutrientes; Ingestão Alimentar; Agentes Terapêuticos

Similarmente ao que acontece com outras doenças do SNC, como os transtornos de ansiedade e afetivos, as Doenças Neurodegenerativas (DNs) apresentam uma ampla interligação com a nutrição, estando envolvida tanto na sua profilaxia, etiologia e terapêutica. Tais doenças associam-se em sua grande parte aos processos decorrentes do envelhecimento¹. Segundo projeções da Organização das Nações Unidas o número de indivíduos com mais de 65 anos na população mundial irá aumentar de 9% em 2010 para 20% em 2050². Essa perspectiva evidencia a necessidade de uma maior compreensão acerca da origem e implicações das doenças neurodegenerativas, bem como maior capacitação de profissionais da área de saúde, médicos, nutricionistas, fisioterapeutas, psicólogos, entre outros, para o atendimento efetivo dos pacientes portadores destas patologias.

As doenças neurodegenerativas (DNs) caracterizam-se por perda progressiva e irreversível de neurônios de regiões específicas do cérebro. Dentre esses distúrbios, destacam-se no corrente artigo a Doença de Parkinson, a Doença de Huntington, a Esclerose Lateral Amiotrófica, mais conhecida como síndrome de ELA e a Doença de Alzheimer. Cada uma dessas doenças apresentam um determinado padrão de degeneração neuronal irreversível em alguma área do encéfalo. Na Doença de Parkinson e Huntington a degeneração concentra-se nos neurônios dos gânglios da base, ocasionando sintomas como anormalidades na execução e ajuste dos movimentos³, na síndrome de ELA, caracterizada inicialmente por fraqueza e progressiva perda dos movimentos a degeneração engloba os motoneurônios espinhais, bulbares e corticais⁴. E na doença de Alzheimer esta degeneração se dá predominantemente no hipocampo e córtex cerebral resultando como sintomas mais proeminentes os distúrbios de memória e cognitivos⁵.

No momento atual o arsenal terapêutico disponível para o tratamento das DNs limita-se a minimizar os sintomas sem qualquer influência sobre a evolução da doença subjacente. O

tratamento sintomático da Doença de Parkinson, em que o déficit neuroquímico produzido pela doença já está bem definido, é em geral relativamente bem sucedido e dispõem-se de agentes farmacológicos eficazes. No entanto, os tratamentos disponíveis para a Doença de Huntington, a síndrome de ELA, e a Doença de Alzheimer são mais limitados em sua eficácia. Torna-se necessário portanto a realização de mais estudos que possibilite a compreensão da fisiopatogenia das DNs possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, podendo incluir agentes farmacológicos e até mesmo a nutrição funcional.

Pouco se sabe sobre a fisiopatogenia das DNs, no entanto atribui-se como aspecto mais notável em comum nessas doenças é a acentuada especificidade dos processos neurodegenerativos em determinados tipos de neurônios, a depender do tipo de DN. A repetição desses padrões de degeneração neuronal levou a proposta de que o processo de lesão neuronal deve ser considerado como a interação de influências genéticas e ambientais com as características intrínsecas de cada população de neurônios afetada que as confere uma vulnerabilidade seletiva. Esses fatores intrínsecos podem incluir a excitotoxicidade, a variação regional da capacidade de metabolismo oxidativo e a produção de radicais livres tóxicos como produto do metabolismo celular que podem resultar em lesões no DNA e em proteínas, bem como peroxidação de lipídeos da membrana plasmática culminando com a morte celular⁶. O entendimento desses fatores pode levar a construção de novas estratégias neuroprotetivas que minimizem a degeneração neuronal.

Sugere-se que a genética desempenhe um papel de extrema importância na etiologia das DNs, onde para algumas delas já foi identificado associação com polimorfismos de pelo menos um gene. Bem descrito na literatura é a relação do desenvolvimento da Doença de Huntington em portadores de polimorfismos em um gene chamado *IT15*, e apresenta um padrão de herança autossômico dominante⁷. Os casos de Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer e síndrome de ELA são em sua maioria esporádicos, porém foram identificadas famílias com alta incidência de cada uma dessas doenças indicando que a genética também possa estar envolvida na fisiopatogenia delas. A Doença de Parkinson está relacionada com polimorfismos de 3 genes ligados a participação de degradação proteica por intermédio da ubiquitina⁸. A Doença de Alzheimer pode desenvolver-se em indivíduos portadores de polimorfismos no gene que codifica a *Proteína Precursora da Amilóide (PPA)*, resultando em formas hereditárias da doença⁹. As mutações no gene que codifica a enzima *Superóxido Cobre zinco dismutase (SOD1)* são responsáveis pelas formas hereditárias da síndrome de ELA¹⁰.

Fatores ambientais também tem sido atribuído à gênese das DN's, como por exemplo agentes infecciosos, toxinas ambientais, e lesões cerebrais. No entanto, no que diz respeito às Doença de Huntington e a síndrome de ELA, não há relações completamente comprovadas entre agentes ambientais e gênese das mesmas. Para Doença de Parkinson foi encontrada a correlação com tais fatores. No início do século XX a Doença de Parkinson foi associada a *encefalite de Von Economo*, também conhecida como encefalite letárgica, onde os pacientes desenvolveram sintomas irreversíveis da doença de Parkinson o que se conceituou de parkinsonismo pós-encefálico¹¹. Com relação a toxinas, pelo menos uma, a Toxina *N-metil-4fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP)* pode produzir uma alteração irreversível que se assemelhe a Doença de Parkinson, embora não se disponha de evidências sobre a ocorrência disseminada dessa toxina ou de alguma outra semelhante no meio ambiente¹². Recentemente, vem sendo dada particular atenção aos pesticidas, sendo atribuído a estes o aumento da incidência da Doença de Parkinson em agricultores¹³.

Relacionando-se aos fatores ambientais, destaca-se um fenômeno recentemente compreendido e que aponta para importantes desdobramentos futuros, a epigenética. O termo epigenética refere-se às diferentes vias biológicas envolvidas na regulação da expressão gênica por meio da interação direta com a sequência de DNA, resultando em metilação do DNA, modificação das histonas e micro RNAs. Observa-se que os mecanismos epigenéticos podem ser potencialmente desencadeados por múltiplos fatores ambientais. Dentre eles, que incluem aspectos do estilo de vida como a prática de atividades física e mental, ocorrência de eventos estressores e exposição a poluentes e materiais tóxicos, destacam-se os fatores nutricionais. Tais fatores podem agir sobre os mecanismos biológicos epigenéticos do organismo que podem determinar ou contribuir para a gênese e progressão de inúmeras patologias através da modificação da expressão gênica. Mais recentemente, tem sido atribuído aos mecanismos epigenéticos a gênese de algumas doenças neurodegenerativas¹⁴, em especial a formação das placas senis β amiloide encontradas no hipocampo de portadores da Doença de Alzheimer associadas a diferencial atividade de metilação gênica¹⁵. Muitos fatores nutricionais são capazes de desencadear mecanismos epigenéticos contribuindo para a fisiopatogenia da Doença de Alzheimer, como por exemplo a contaminação e acúmulo de metais pesados advindas do alimento¹⁶, bem como por pesticidas¹⁷. Algumas moléculas decorrentes da metabolização do álcool também apresentam a propriedade de agirem como fatores transcripcionais e modificadores da cromatina¹⁸. Similarmente, a deficiência de algumas vitaminas do complexo B, como a vitamina B6 e B12, também associam-se a mecanismos epigenéticos na doença de

Alzheimer¹⁹. Não surpreendentemente a suplementação com vitamina B em pacientes portadores da doença de Parkinson resultou em redução da atrofia da substância cinzenta em regiões vulneráveis a doença, incluindo o lobo médio-temporal²⁰.

No tocante aos fatores de vulnerabilidade seletiva das populações de neurônios, esta pode estar diretamente relacionada com a excitotoxicidade, que é resultante do excesso do neurotransmissor glutamato²¹. O glutamato é utilizado como neurotransmissor em muitos circuitos neurais diferentes e age como um neurotransmissor excitatório. Embora o glutamato seja essencial para o funcionamento normal do cérebro, sua presença em quantidades excessivas pode resultar em morte celular excitotóxica²¹. Os efeitos destrutores do glutamato se dão por intermédio de um de seus receptores, chamados NMDA, que ao contrário dos demais receptores deste neurotransmissor, que regulam a entrada de Na⁺, regula também a entrada de íons Ca²⁺²². Quando os receptores NMDA são superativados, uma grande quantidade de Ca²⁺ entra no meio intracelular permitindo a ativação de uma ampla cascata de eventos intracelulares potencialmente destrutivos, podendo gerar a morte celular²². O papel da excitotoxicidade na etiologia das doenças neurodegenerativas é pouco conhecida, mas sugere-se a existência de diferenças regionais e tipos celulares que apresentam maior probabilidade em sofrer excitotoxicidade, a depender da densidade dos receptores NMDA encontrados em suas membranas.

O glutamato é um neurotransmissor aminoácido, sendo este aminoácido também adquirido por intermédio da dieta. Assim sendo, o consumo de quantidades excessivas de alimentos contendo este aminoácido pode exacerbar os efeitos excitatórios do glutamato no cérebro. Um exemplo prático é a chamada “síndrome do restaurante chinês”, caracterizada por um conjunto de sintomas decorrentes do consumo excessivo de glutamato monossódico, uma fonte alimentar do glutamato. Alguns desses sintomas assemelham-se, em menor grau, aos que são observados em algumas DNs, como fraqueza muscular nos membros, dores, rigidez no pescoço, além de dores de cabeça, vômitos e hiperatividade em crianças²³. Essas observações podem ser coerentes com os efeitos de excitotoxicidade do glutamato advindo do glutamato monossódico. Alguns estudos vêm buscando a relação entre o consumo de glutamato monossódico, neurodegeneração por excitotoxicidade e DNs. Embora os estudos ainda sejam escassos, recentemente, Dief e colaboradores demonstraram que a administração via oral e subcutânea de glutamato monossódico em ratos resultou em aumento na morte neuronal no hipocampo bem como aumento na quantidade de placas senis chamadas de *placas beta*

*amiloide*²⁴, encontradas em grandes quantidades em indivíduos portadores da doença de Alzheimer⁵.

O metabolismo e envelhecimento da célula também estão diretamente relacionados com a etiologia das DN, além de associadas à vulnerabilidade seletiva das populações neuronais²⁵. Muitos dos distúrbios metabólicos que ocorrem na célula são resultantes do envelhecimento e do acúmulo de mutações no DNA das mitocôndrias²⁶. Pacientes portadores da Doença de Parkinson apresentam diversos defeitos no metabolismo da célula, bem como nas mitocôndrias que são superiores aos esperados para a sua idade²⁶. Similarmente, a manipulação de drogas que comprometem o metabolismo energético das mitocôndrias, como a referida droga MPTP, promove degeneração neuronal irreversível semelhante aos observados em indivíduos portadores da Doença de Parkinson, explicando a ocorrência dos sintomas da doença em indivíduos que fizeram uso da droga²⁷.

Embora o metabolismo oxidativo seja de extrema importância para o funcionamento fisiológico dos organismos, o mesmo apresenta como resultado a liberação de radicais livres. Essas espécies reativas, quando não controladas, podem levar à lesão do DNA e proteínas, peroxidação dos lipídios da membrana plasmática culminando em morte celular. Diversos são os mecanismos criados pelo organismo que objetivam a neutralização dessas espécies reativas e como consequência limitar o estresse oxidativo. Dentre esses mecanismos, destacam-se os enzimáticos, como a presença da enzima superóxido dismutase (SOD), bem como a presença de compostos redutores como a glutatona, vitamina C, vitamina E e selênio²⁸, esses últimos sendo adquiridos por intermédio da dieta. A nutrição funcional torna-se então, um assunto em destaque na busca da compreensão da fisiopatogenia e até tratamento das DN. O consumo de alimentos fonte em glutatona, vitaminas C e E e selênio, que estão incluídos na lista de alimentos antioxidantes, podem constituir uma medida profilática às DN. Similarmente, o consumo de alimentos cuja metabolização é responsável pela excessiva produção de espécies reativas de oxigênio podem acelerar ou mesmo dar início aos processos que culminam em morte neuronal contribuindo para surgimento do conjunto sintomatológico característico de alguma DN.

Uma evidência que engloba alguns dos fatores predisponentes ao desenvolvimento de alguma DN é o que ocorre com a Doença de Parkinson, envolvendo o metabolismo celular e a característica da população de neurônios que lhe confere vulnerabilidade. Sabe-se que esta doença é resultante da morte de neurônios dopaminérgicos presentes na *Substancia Nigra*³. A metabolização do neurotransmissor dopamina na presença da enzima Monoamina Oxidase

(MAO) resulta no metabólito ácido diidroxifenilacético (DOPAC) e peróxido de hidrogênio²⁹. O peróxido de hidrogênio, na presença de íons ferroso, constando em grandes quantidades na *Substancia Nigra*, é responsável por uma grande produção de radicais livres, aumentando a predisposição de morte celular nesta população de neurônios³⁰. Assim sendo, a Doença de Parkinson pode ter como fisiopatogenia, a metabolização da dopamina na *Substancia Nigra*.

De modo particular, as diferentes DN's apresentam características fisiopatológicas e sintomatológicas específicas. A Doença de Parkinson apresenta como conjunto sintomatológico; tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e hipocinesia, que inclui diminuição da expressão facial ou face em máscara, diminuição da gesticulação, disartria e disfagia e andar lento, perda de reflexos posturais, congelamento, que consiste na incapacidade momentânea de realizar movimentos, distúrbios do sono, pode ocorrer alterações de humor como ansiedade, depressão, psicose, bem como processamento lento do pensamento, perda de concentração e demência. A progressão da doença culmina com a morte do paciente em decorrência de complicações da imobilidade, como pneumonia por aspiração e embolia pulmonar³¹.

Do ponto de vista fisiopatológico, a Doença de Parkinson é caracterizada por perda neuronal nos gânglios da base³. Tais gânglios são um conjunto de núcleos de corpos de neurônios na região subcortical, imersos em substancia branca, que inclui o núcleo caudado e o putamen, que juntos formam o estriado, o globo pálido, o núcleo subtalamico e a Substancia Nigra³². Sabe-se que indivíduos portadores da Doença de Parkinson apresentam como características em comum a perda de cerca de 70 a 80% dos neurônios dopaminérgicos nos gânglios da base, mais especificamente na parte compacta da substancia Nigra que fornece inervação dopaminérgica ao estriado. Esta perda neuronal promovendo uma redução de cerca de 80% no conteúdo da dopamina no estriado³³. Atribui-se, portanto, à deficiência do sistema de neurotransmissão dopaminérgico, parte da fisiopatogenia da Doença de Parkinson³³. Não surpreendentemente, muitas das estratégias terapêuticas visam a manipulação do Sistema de neurotransmissão dopaminérgico sendo relativamente bem sucedidos no tratamento desta doença.

Em conjunto, os gânglios da base agem como uma unidade recebendo informação de todo o córtex cerebral integrando-as com outras áreas corticais responsáveis pelo ajuste motor fino, bem como o seu planejamento³². Tem como função, assim, o ajuste do planejamento motor e coordenação motora. Diferente da maioria dos componentes que formam o sistema que

controla os movimentos, os gânglios da base não têm conexões diretas com a medula espinhal, portanto, eles não se conectam diretamente com os motoneurônios. Os gânglios da base estão estreitamente ligados ao córtex cerebral com quem interagem funcionalmente através de alças de retro-alimentação ou feedback³⁴. Tais gânglios recebem aferências provenientes de várias regiões do córtex cerebral. Essas informações transitam através desses núcleos e posteriormente são transmitidas ao tálamo que as reenvia de volta ao córtex cerebral. Entretanto as aferências que entram nos gânglios da base são provenientes de diferentes áreas corticais, enquanto as eferências que retornam ao córtex através do tálamo, depois de processadas, se dirigem a regiões específicas corticais relacionada à função motora modulada, como a área motora suplementar (AMS) e área pré-frontal (APF). Essas duas áreas-alvo estão ligadas ao processamento de funções superiores no controle do movimento e estão localizadas ao lado do córtex motor primário³⁴.

Em breve descrição do funcionamento fisiológico dos gânglios da base e suas conexões corticais destaca-se o estriado, que recebe influxo excitatório glutamatergico das áreas corticais. Deste projeta-se uma via direta e outra indireta cujo trajeto retorna ao córtex. A via direta lança transmissão inibitória GABAérgica para o globo pálido medial e para a porção reticular da substancia nigra. Este por sua vez, emite projeções inibitórias gabaérgicas para o tálamo. E o tálamo emite projeções excitatórias glutamatergicas para o córtex motor. Desse modo, quando o estriado é ativado pelo córtex ele inibe o globo pálido e isto resulta em entrada excitatório no córtex pelo tálamo. Isso resulta em uma facilitação do movimento³⁵. Já na via indireta, os neurônios do estriado emitem projeções inibitórias GABAérgicas para o globo pálido lateral. Este por sua vez, podem emitir projeções inibitórias gabaérgicas para os núcleos subtalâmicos, que proporciona projeções excitatórias para o globo pálido medial, que inibi o tálamo através de projeções gabaérgicas. Assim sendo, o córtex ao excitar o estriado, resulta em inibição do globo pálido lateral, que irá diminuir a inibição nos núcleos subtalamicos resultando em aumento da excitação no globo pálido medial. A ativação deste núcleo promove redução do efluxo excitatório para o córtex, inibindo o movimento³⁵.

Ambas vias são influenciadas por projeções dopaminérgicas vindas da área compacta da substancia nigra. É por intermédio destas projeções dopaminérgicas que as aferencias vindas do córtex fazem ligação com os neurônios do estriado³⁶. Os neurônios do estriado sintetizam dois tipos de receptores específicos, o que dá origem a via direta sintetiza os receptores D1, que ao receberem a dopamina como ligante apresenta função excitatória. O que dá origem a via indireta sintetiza os receptores D2, cuja função é inibitória³⁶. Sendo assim, a dopamina no

estriado tende a aumentar a atividade da via direta e a reduzir a atividade da via indireta, enquanto que a depleção de dopamina tem efeito oposto, inativa a via direta e ativa a via indireta. Assim sendo, podemos concluir que a dopamina tem um efeito facilitador do movimento³⁶. Na doença de Parkinson a morte de neurônios dopaminérgicos na *substantia Nigra* leva a uma redução da ativação da via direta e uma redução da inibição da via indireta. A consequência é uma redução do efluxo excitatório do tálamo ao córtex resultando em sintomas como redução dos movimentos, rigidez muscular, congelamento, entre outros³⁷.

Como estratégias terapêuticas no tratamento da doença de Parkinson, destacam-se aquelas cujo mecanismos de ação envolvem o aumento no conteúdo de dopamina nos gânglios da base. Uma dessas estratégias amplamente aceita no tratamento desta doença é a Levodopa. Trata-se de um aminoácido que é utilizado como precursor da dopamina³⁸. Este aminoácido é transportado para o interior do terminal axonal dos neurônios dopaminérgicos do estriado e *substantia Nigra*, e uma vez dentro da célula, ele é descarboxilado em dopamina³⁹. A dopamina produzida é internalizada dentro das vesículas sinápticas e aí permanecerão até que a célula seja despolarizada e a dopamina lançada na fenda sináptica⁴⁰. Entretanto, a eficiência da levodopa é largamente influenciada pela dieta. Por ser um aminoácido, a levodopa pode sofrer competição com outros aminoácidos de origem alimentar nos transportadores presentes no intestino, e consequentemente ter sua absorção reduzida⁴¹. A levodopa é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal, portanto, de modo a minimizar a competição da sua absorção com outros aminoácidos, é recomendado que ele não seja administrado concomitantemente com alimentos, principalmente os ricos em proteínas, e que haja um intervalo entre a administração e o consumo de alimentos. Sugere-se que esse intervalo seja de uma hora antes ou após a administração da levodopa⁴¹.

Outros agentes farmacológicos utilizados no tratamento da doença de Parkinson são os agonistas dos receptores da dopamina. Estes agentes consistem em agonistas dos receptores dopaminérgicos do tipo D2 nos neurônios do estriado⁴². Tendo em vista que esses receptores quando ligados à dopamina são responsáveis pela inibição da via indireta, e que esta via promove efluxo inibitório para o córtex motor, sua inibição reduz o efluxo inibitório para o córtex motor levando a uma melhora nos movimentos do paciente⁴². A utilização dos agonistas dos receptores dopaminérgicos pode conferir uma vantagem nos casos mais avançados da doença, já que diferentes da levodopa, esses fármacos não irão precisar de uma maquinaria enzimática funcional de síntese de dopamina nesses neurônios⁴⁴. Além disso, se a hipótese de que a formação de radicais livres resultantes do metabolismo da dopamina contribui para a

morte neuronal estiver correta, os agonistas dos receptores da dopamina podem minimizar a evolução da doença, já que eles resultam em redução da liberação de dopamina endógena⁴⁵. Em contrapartida, a levodopa teria uma ação que pode potencializar o estresse oxidativo e contribuir para a morte neuronal⁴⁵.

Os chamados agentes inibidores da COMT e da MAO também podem ser utilizados como estratégia terapêutica no tratamento do Parkinson⁴⁶. A COMT e a MAO são duas enzimas que metabolizam a dopamina. A ação sequencial dessas duas enzimas degrada a dopamina a um metabólito estável, o *ácido homovalínico (HVA)*, que é excretado na urina. A inibição da atividade destas duas enzimas resulta em aumento do tempo de meia vida da dopamina e da levodopa nos neurônios do estriado⁴⁶. Além desses inibidores serem administrados sob a forma de agentes farmacológicos, alguns componentes ingeridos na dieta, como o Ginkgo biloba, podem ter efeito similar aos agentes farmacológicos⁴⁷. Sabe-se que o consumo de extratos de Ginkgo biloba aumenta a atividade dopaminérgica pois permite que esse neurotransmissor permaneça no encéfalo por mais tempo⁴⁸. Este fenômeno se dá pelo fato de que este extrato atua como inibidor da enzima MAO (monoamina oxidase)⁴⁸. Em um estudo experimental, Ahmad e colaboradores submeteram ratos com doença de Parkinson a tratamento com doses diárias de Ginkgo biloba. Após três semanas de tratamento, os ratos não só melhoraram dos sintomas típicos do Parkinson como aumentaram o número de projeções dopaminérgicas para o estriado⁴⁷. Além de ser um inibidor da enzima MAO, o Ginkgo biloba também é um potente antioxidante, podendo contribuir na profilaxia da morte neuronal por estresse oxidativo⁴⁹.

A dieta ainda pode estar mais diretamente relacionada com a gênese da doença de Parkinson e ainda ter ação terapêutica. Coimbra e colaboradores verificaram que pacientes portadores da doença de Parkinson apresentam deficiência nos níveis séricos da vitamina B2⁵⁰. Assim sendo, este mesmo estudo demonstrou que o tratamento com 30mg de vitamina B2 a cada 8 horas durante seis meses promoveu melhoras significativas na capacidade motoras desses pacientes⁵⁰. Esses mesmos autores observaram que o consumo de carne vermelha por esses pacientes era acima da média, sendo a retirada deste componente na dieta uma das estratégias terapêuticas abordadas no estudo. A digestão da carne vermelha libera uma toxina chamada hemina. Esta toxina aumenta a concentração intracelular de ferro o que promove um aumento na produção de radicais hidroxila contribuindo para a morte celular. A hemina absorvida é inativada pela ação da enzima heme-oxigenase⁵¹. Esta enzima converte a hemina em biliverdina, e esta sofrerá a ação da enzima flavoenzima citocromo P450 redutase⁵². Esta

enzima tem seu funcionamento dependente da vitamina B2 e é particularmente sensível a sua deficiência⁵³. Sugere-se que a deficiência em vitamina B2 resulte em incapacidade da inativação da hemina com consequente aumento de seus níveis plasmáticos, que ao alcançar o encéfalo, promove morte neuronal⁵⁰. Além disso, a hemina pode se ligar a glutatona reduzindo sua atividade e aumentando o estresse oxidativo⁵⁴. Não surpreendentemente, a enzima heme-oxigenase encontra-se quase sempre aumentada nos astrocitos de pacientes portadores da doença de Parkinson⁵⁵.

A doença de Huntington também é outra DN com sintomas motores proeminentes. No início da manifestação, os sintomas da doença de Huntington englobam descordenação motora fina e comprometimento dos movimentos oculares rápidos. Os sintomas progredem para movimentos rápidos, semelhantes a abalos dos membros, do tronco, do rosto, e do pescoço, chamado de coréia. Decorrentes destes sintomas resulta a dificuldade na marcha e desequilíbrio, além de disartria e disfagia. Estão presentes também as alterações cognitivas, com falhas na memória e lentidão no processamento do pensamento, progredindo para uma demência. Os distúrbios psiquiátricos são comuns, como ansiedade, depressão e até psicoses. Em muitos pacientes, estes distúrbios precedem os sintomas motores. Com a evolução da doença, surgem os tremores, rigidez muscular e acinesia, levando o paciente à paralização, semelhante ao que acomete os portadores de Parkinson. De modo geral os pacientes chegam a óbito devido a complicações decorrentes da imobilidade⁵⁶.

Do ponto de vista fisiopatológico, a doença de Huntington é caracterizada por acentuada perda de neurônios no estriado (caudado/putamen). No entanto, esta perda se dá obedecendo uma vulnerabilidade seletiva, acometendo primeiro os neurônios que ativam a via indireta e por último a via direta⁵⁶. A perda de ativação da via indireta propicia efluxo excitatório para o córtex motor resultando em movimentos exacerbados condizentes com os principais sintomas da doença. Com a progressão, os neurônios das duas vias são igualmente acometidos, e o resultado final é hipocinesia e rigidez muscular⁵⁶. Atribui-se à doença de Huntington um componente genético muito forte envolvido em sua fisiopatogenia, pois apresenta uma herança autossômica dominante. Essa doença está associada com a mutação em um gene, o *IT15*, responsável pela síntese de uma proteína denominada *huntingtina*. Embora esta proteína seja traduzida com grande distribuição por todo encéfalo e outros órgãos periféricos, sua função ainda não foi descoberta. Tampouco o motivo pela qual a mutação no gene que a codifica resultaria em degeneração seletiva dos neurônios estriatais. Não se descarta a possibilidade que a vulnerabilidade seletiva a degeneração dos neurônios estriatais possam estar envolvidos com

excitotoxicidade e disfunções sistêmicas metabólicas, visto que os portadores da doença de Huntington apresentam como característica em comum o fato de serem magros⁵⁷. Sendo assim, sugere-se que a doença de Huntington resulte da disfunção metabólica generalizada associada a vulnerabilidade dos neurônios estriatais. Essa vulnerabilidade pode ser resultante da capacidade de formar radicais livres bem como a quantidade de receptores NMDA²¹.

Atualmente nenhum fármaco disponível no mercado é capaz de retardar a progressão da doença de Huntington, e muitos dos agentes utilizados podem apresentar excessivos efeitos colaterais⁵⁸. O tratamento é apenas indicado para pacientes deprimidos, irritáveis, paranoicos, excessivamente ansiosos e psicóticos. Neste caso se utilizam os fármacos, antidepressivos, antipsicóticos e ansiolíticos⁵⁹. No caso de pacientes com coreia muito acentuada, causando quedas frequentes com machucados e lesões, pode-se tentar o uso de agentes que promovem a depleção da dopamina, visto que este transmissor ativa a via indireta e propicia os movimentos⁶⁰. Nos casos de pacientes cujos movimentos são agravados em decorrência da ansiedade ou estresse, o uso de sedativos e ansiolíticos como os benzodiazepínicos pode ser recomendado⁶¹.

Um estudo recente aponta para uma relação entre dieta e gênese da doença de Huntington⁶². Neste estudo foi observado que indivíduos portadores da mutação no gene *IT15* apresentam uma maior probabilidade de começarem a apresentar os primeiros sintomas da doença a depender do tipo de dieta consumida meses antes do início dos sintomas. O conteúdo desta dieta consiste em laticínios, como leite, queijo, iogurtes, entre outros⁶². Sugere-se que o consumo desses alimentos pode reduzir os níveis plasmáticos de ácido úrico. Estudos anteriores demonstraram uma possível associação entre níveis reduzidos de ácido úrico no sangue e uma progressão mais rápida da doença de Huntington⁶³. No entanto, mais estudos são necessários para o comprovação e compreensão desta relação. A comprovação desta relação poderia compor uma estratégia profilática de modo a retardar o início do aparecimento do conjunto sintomatológico da doença de Huntington, que consistiria na retirada de laticínios na dieta de indivíduos com histórico familiar da doença. Além disso, os pacientes portadores da doença de Huntington necessitam de muita atenção acerca da dieta e nutrição apresentando dificuldades de manter um peso corporal saudável. Isto decorre da dificuldade em deglutir alimentos, aumento das necessidades calóricas devido ao esforço físico resultante da exacerbação dos movimentos, bem como demais problemas metabólicos. Dependendo do caso, para garantir uma nutrição adequada, o paciente deverá ter mais de três refeições diárias, de preferência com alimentos moles para facilitar a deglutição⁶⁴.

A esclerose lateral amiotrófica, também conhecida como Síndrome de ELA é caracterizada por fraqueza muscular rapidamente progressiva, atrofia muscular, sintomas que se iniciam em um lado do corpo. Com o avançar da doença aparece a disartria, disfagia, e comprometimento respiratório. Em geral, a função sensorial é preservada bem como as habilidades cognitivas, autônoma e óculomotora. Trata-se de uma doença progressiva e fatal, a morte em geral é decorrente de complicações advindas da imobilidade⁴. Todo o quadro sintomatológico da síndrome de ELA é resultado da degeneração dos motoneuronios do corno ventral da medula e tronco encefálico. Estes neurônios se projetam para os músculos estriados e de neurônios piramidais do córtex motor⁴. Com o avanço da doença, a musculatura lisa vai progressivamente perdendo a conexão com o SNC, e a atrofia muscular é resultante da ausência de inervação com motoneuronios⁴. Atribui-se a gênese desta doença a mutação no gene codificador da enzima *Superoxido dismutase (SOD1)*. No entanto a síndrome de ELA transmitida geneticamente é responsável por apenas 10% dos casos¹⁰. Os outros 90% tem causa ainda não conhecida, mas sugere-se ser resultante de doenças autoimune, excitotoxicidade, produção excessiva de radicais livres e infecções virais^{65, 66}.

O agente farmacológico utilizado no tratamento da síndrome de ELA é o riluzol, fármaco de ação complexa sobre o SNC. Este fármaco atua em nível de sistema de neurotransmissão glutamatérgico bloqueando a liberação deste neurotransmissor, e também agindo como antagonista dos receptores NMDA, agindo possivelmente minimizando a excitotoxicidade⁶⁷. O riluzol apresenta efeitos modestos e ainda pouco compreendidos. No maior estudo clínico realizado até o presente momento mostrou que a utilização deste fármaco aumentou em 60 dias o tempo de sobrevida de pacientes portadores da síndrome⁶⁷. Embora seus efeitos sejam modestos, este fármaco representa um marco terapêutico visto ser o único que se mostrou efetivo na amenização de alguns sintomas da síndrome de ELA. No entanto, adjuvante ao riluzol, alguns estudos vêm demonstrando o impacto da nutrição na progressão da Esclerose Lateral Amiotrófica. A vitamina B12 é considerada como um agente de grande ação neurológica, estando envolvidos em processos de regeneração neuronal sem apresentar toxicidade⁶⁸. Um estudo em humanos, indivíduos portadores da esclerose lateral amiotrófica foram tratados com altas doses de metilcobalamina, a forma ativa da vitamina B12. A investigação demonstrou que a vitamina B12 promoveu aumento da mielinização e regeneração neuronal, sem quaisquer efeitos colaterais, melhorando a performance motora desses pacientes⁶⁹. Além da vitamina B12, as vitaminas do complexo D, em especial a vitamina D3, também tem sido apontada como um componente alimentar responsável pela melhora de alguns

dos sintomas motores da síndrome. Esta vitamina age possivelmente, suprimindo a expressão de alguns genes envolvidos com a ativação do sistema imune. Visto que a esclerose lateral amiotrófica pode ter sua gênese em processos autoimunes, a vitamina D3 estaria então suprimindo o processo que daria início à síndrome.

Das doenças aqui abordadas, a doença de Alzheimer é a única que não apresenta sintomas motores no seu início, embora evoluam para eles. Inicialmente, a doença de Alzheimer caracteriza-se pelos seguintes sintomas clássicos; comprometimento cognitivo gradual e progressivo, da memória recente, comprometimento da atenção, orientação, aprendizado e linguagem. Tais dificuldades de memória e perda de capacidades intelectuais, podem ser tão sutis no início da manifestação da doença que passam despercebidos, tanto pelo próprio portador da doença como pelos familiares e amigos. No entanto, à medida que a doença progride, os sintomas tornam-se cada vez mais notórios e começam a interferir no trabalho de rotina e com as atividades sociais. Sintomas como alterações de personalidade e comportamento começam a despontar, além dos distúrbios afetivos e de humor, como ansiedade e depressão. Nos estágios mais avançados da doença, as contraturas musculares caracterizam um quadro importante onde as complicações decorrentes da imobilidade é que levam a óbito, como a pneumonia e a embolia pulmonar.

Com relação à fisiopatogenia da doença de Alzheimer, é caracterizada por acentuada atrofia do córtex cerebral com perdas neuronais corticais e subcorticais⁵. No entanto as características patológicas proeminentes na doença de Alzheimer são percebidas em análises histológicas, onde observa-se a presença de placas proteicas senis que são acúmulos esféricos de proteínas chamadas de beta amiloide. Acompanhando essas placas encontra-se emaranhados neurofibrilares e processos de degeneração neuronal⁷⁰. Embora essas placas senis possam ser encontradas em indivíduos intelectualmente normais, elas são muito mais abundantes em indivíduos portadores da doença de Alzheimer, sendo essa densidade diretamente proporcional ao grau de gravidade da doença⁷⁰. Elas são mais abundantes no hipocampo e em regiões associadas no córtex, não surpreendentemente o conjunto sintomatológico da doença envolva comprometimento de memória e outras funções cognitivas⁵. Sabe-se que a proteína beta amiloide é derivada de uma proteína de cadeia maior chamada de Proteína Precursora da Beta Amiloide (PPA). Essa proteína está presente distribuída no encéfalo de indivíduos saudáveis, mas sua função ainda permanece desconhecida. Sugere-se que esteja envolvida em processos de sinalização celular. Atribui-se a formação das placas de beta amiloide à clivagem anormal da PPA. Essa anormalidade pode ser resultante de alterações genéticas tanto dos genes

codificadores da PPA como da sua enzima de clivagem, a BACE⁷¹. De fato, a forma hereditária da doença de Alzheimer envolve o polimorfismo do gene da PPA.

No tocante à neuroquímica do encéfalo do portador da doença de Alzheimer, é observado uma redução considerável de uma grande quantidade de neurotransmissores. Dentre eles, se destaca a acentuada redução da acetilcol. A base anatômica da deficiência colinérgica é a atrofia e degeneração dos neurônios colinérgicos subcorticais, principalmente aqueles da parte basal do prosencéfalo, como o núcleo basal de Meynert que provê neurotransmissão colinérgica a todo o córtex cerebral⁷². Essa informação é confirmada pelo fato da utilização de antagonistas para receptores colinérgicos centrais induzir a um quadro demencial semelhante ao da doença de Alzheimer em camundongos. Sugere-se assim, a hipótese colinérgica. Não surpreendente as estratégias farmacológicas mais eficientes para o tratamento da doença de Alzheimer promovem manipulação da neurotransmissão colinérgica. Dentre esses fármacos, nós destacamos a lecitina, cloreto de colina, que é um precursor da acetilcolina. Esta permite um aumento dos níveis de acetilcolina no encéfalo por fornecer-lhe seu precursor⁷³. Outro agente farmacológico bem empregado no tratamento da doença de Alzheimer é um inibidor da acetilcolinesterase⁷³. Essa enzima está presente na fenda sináptica e promove degradação da acetilcolina em colina e ácido acético. Uma vez sendo inibida a ação desta enzima, há um aumento na disponibilidade da acetilcolina na fenda sináptica. É importante salientar que outros agentes farmacológicos novos estão sendo testados para este tratamento. A maioria deles tem como objetivo minimizar o estresse oxidativo, como antagonistas dos receptores NMDA do glutamato, bem como alguns antioxidantes.

Além dos agentes farmacológicos, um componente alimentar tem sido apontado como aliado no tratamento e prevenção da doença de Alzheimer, a cúrcuma. A planta cúrcuma é também popularmente conhecida como açafrão-da-terra, açafrão-da-índia, gengibre amarelo. Trata-se de uma planta originária da Índia e amplamente cultivada no mundo utilizadas para fins condimentar e medicinais. Estudos epidemiológicos apontam que a incidência de doença de Alzheimer na Índia é um dos mais baixos do mundo, sendo atribuído a este fato o alto consumo de cúrcuma, bem como seu uso como planta medicinal⁷⁴. Atualmente, sabe-se que compostos polifenólicos derivados da cúrcuma possuem ação antioxidante e anti-inflamatória e portanto neuroprotetora, podendo ser utilizado no tratamento de doenças relacionadas ao envelhecimento⁷⁵. Associa-se ao efeito anti-inflamatório da cúrcuma a redução do processo inflamatório que faz parte da fisiopatogenia das placas β -amiloides, resultando em redução da formação das mesmas. Em roedores, a administração da cúrcuma resultou em diminuição do

estresse oxidativo, degradação de fibras de β -amilóide e prevenção de formações fibrilares. Entretanto, a cúrcuma também tem sido efetiva no tratamento e prevenção de outras doenças neurodegenerativas. Estudos em modelos animais para doença de Parkinson compostos derivados da cúrcuma, os curcuminóides, apresentaram ação neuroprotetora com aumento nos níveis de enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase. Adicionalmente, foi observado um aumento nos níveis de dopamina no núcleo estriado, à maneira dos agentes farmacológicos utilizados no tratamento da doença de Parkinson⁷⁶.

Reunidas, as DNs formam uma classe de doenças cuja fisiopatogenia ainda apresenta muitas lacunas a serem preenchidas, constituindo uma incógnita quanto a fatores profiláticos e melhores agentes terapêuticos. Estudos clássicos, mostraram a incidência de tais doenças em indivíduos da mesma família evidenciando que muitos desses casos apresentavam um componente hereditário, como de fato foi demonstrado por inúmeros estudos que relacionam polimorfismos em determinados genes à degeneração neuronal característica. No entanto, uma grande porcentagem dos casos registrados não apresenta relações hereditárias. Com os avanços dos estudos científicos, uma ampla gama de publicações recentes aponta maiores possibilidades em termos de compreensão e terapêutica. Nesse sentido, a nutrição demonstra-se um fator proeminente na fisiopatogenia de algumas DNs, onde tanto seu excesso, como o glutamato monossódico e carne vermelha, por exemplo, como sua carência, no caso de algumas hipovitaminoses, podem compor processos subjacentes à degeneração neuronal, estando envolvidos ou não aos mecanismos epigenéticos. Estando o alimento envolvido na gênese dessas doenças, sua utilização também pode se dar de forma terapêutica. Trata-se da nutrição funcional aplicada ao serviço das DNs. Alimentos antioxidantes, anti-inflamatórios, como a cúrcuma, e suplementação de algumas vitaminas, como a vitamina B e D, tem constituído eficientes aliados não só na melhora do conjunto sintomatológico quanto no declínio da degeneração neuronal. Adicionalmente, alguns componentes alimentares podem apresentar moléculas semelhantes a alguns fármacos podendo apresentar efeitos similares a eles, como por exemplo a *Ginkgo biloba*, um agente inibidor da MAO em potencial. Assim sendo, a nutrição funcional é apontada como uma importante vertente científica com grandes perspectivas na terapêutica das DNs.

Referencias:

1. Rodríguez-Rodero S, Fernández-Morera JL, Menéndez-Torre E, Calvanese V, Fernández AF, Fraga MF. Aging genetics and aging. *Aging Dis.* 2011 Jun;2(3):186-95.

2. UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs. Population Division. World Population Ageing: 1950-2050. Resumen Ejecutivo. Disponible em: <http://www.un.org/esa/population/publications/worldageing19502050/pdf/65executiv_summary_spanish.pdf>.
3. **Gibb WR** Neuropathology of Parkinson's disease and related syndromes. **Neurol Clin.** 1992 May;10(2):361-76.
4. **Rowland LP**. Amyotrophic lateral sclerosis: theories and therapies. **Ann Neurol.** 1994 Feb;35(2):129-30.
5. **Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW**. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. **Cereb Cortex.** 1991 Jan-Feb;1(1):103-16.
6. **Fang C, Bourdette D, Banker G** Oxidative stress inhibits axonal transport: implications for neurodegenerative diseases. **Mol Neurodegener.** 2012 Jun 18;7:29. doi: 10.1186/1750-1326-7-29.
7. Djousse L, B. Knowlton, M. R. Hayden et al., "Evidence for a modifier of onset age in Huntington disease linked to the HD gene in 4p16," *Neurogenetics*, vol. 5, no. 2, pp. 109–114, 2004.
8. **Duvoisin RC** Role of genetics in the cause of Parkinson's disease. **Mov Disord.** 1998;13 Suppl 1:7-12.
9. Mullan M, Houlden H, Windelspecht M, Fidani L, Lombardi C, Diaz P, et al. A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha1-antichymotrypsin gene. *Nat Genet* 1992;2:340–2.
10. **Cudkowicz ME, Brown RH Jr**. An update on superoxide dismutase 1 in familial amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurol Sci.** 1996 Aug;139 Suppl:10-5.
11. **Berger JR, Vilensky JA²**. Encephalitis lethargica (von Economo's encephalitis). **Handb Clin Neurol.** 2014;123:745-61.
12. **Ballard PA, Tetrad JW, Langston JW**. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. **Neurology.** 1985 Jul;35(7):949-56.
13. **Moretto A, Colosio C**. Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson's disease. **Neurotoxicology.** 2011 Aug;32(4):383-91. doi: 10.1016/j.neuro.2011.03.004. Epub 2011 Mar 23.
14. Marques, S.C., Oliveira, C.R., Pereira, C.M., Outeiro, T.F., 2011. Epigenetics in neurodegeneration: a new layer of complexity. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 348–355.
15. Fuso, A., Nicolai, V., Ricceri, L., Cavallaro, R.A., Isopi, E., Mangia, F., Fiorenza, M.T., Scarpa, S., 2012. S-adenosylmethionine reduces the progress of the Alzheimer-like features induced by B-vitamin deficiency in mice. *Neurobiol. Aging* 33, e1–e16 (1482).
16. Olde Rikkert, M.G., Verhey, F.R., Sijben, J.W., Bouwman, F.H., Dautzenberg, P.L., Lansink, M., Sipers, W.M., van Asselt, D.Z., van Hees, A.M., Stevens, M., Vellas, B., Scheltens, P., 2014. Differences in nutritional status between very mild Alzheimer's disease patients and healthy controls. *J. Alzheimers Dis.* 41, 261–271.
17. Shutoh, Y., Takeda, M., Ohtsuka, R., Haishima, A., Yamaguchi, S., Fujie, H., Komatsu, Y., Maita, K., Harada, T., 2009. Low dose effects of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) on gene transcription and DNA methylation in the hypothalamus of young male rats: implication of hormesis-like effects. *J. Toxicol. Sci.* 34, 469–482.
18. Chen, Y., Ozturk, N.C., Zhou, F.C., 2013. DNA methylation program in developing hippocampus and its alteration by alcohol. *Plos One* 8, e60503.
19. Mastroeni, D., Grover, A., Delvaux, E., Whiteside, C., Coleman, P.D., Rogers, J., 2011. Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 32, 1161–1180.
20. Douaud, G., Refsum, H., de Jager, C.A., Jacoby, R., Nichols, T.E., Smith, S.M., Smith, A.D., 2013. Preventing Alzheimer's disease-related gray matter atrophy by B-vitamin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9523–9528.
21. **Lipton SA, Rosenberg PA**. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med.** 1994 Mar 3;330(9):613-22.
22. Choi D. W. (1995) Calcium: still center stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* 18:58–60. CrossRefMedlineWeb of Science

23. Yang WH, Drouin MA, Herbert M, Mao Y, Karsh J. The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Jun;99(6 Pt 1):757-62.
24. Dief AE, Kamha ES², Baraka AM³, Elshorbagy AK⁴ Monosodium glutamate neurotoxicity increases beta amyloid in the rat hippocampus: a potential role for cyclic AMP protein kinase. *Neurotoxicology*. 2014 May;42:76-82. doi: 10.1016/j.neuro.2014.04.003. Epub 2014 Apr 24.
25. **Calne DB, Eisen A, McGeer E, Spencer P.** Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and motoneurone disease: abiotrophic interaction between ageing and environment? **Lancet**. 1986 Nov 8;2(8515):1067-70.
26. **Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W.** Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? **Trends Neurosci**. 1993
27. **Przedborski S¹, Jackson-Lewis V.** Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord*. 1998;13 Suppl 1:35-8.
28. McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol. Chem.* 244, 6049-6055
29. Faro, R, Dura'n,† J. L. M. do Nascimento,* M. Alfonso,† and C. W. Picanc,o-Diniz* Effects of Methyl Mercury on the in Vivo Release of Dopamine and Its Acidic Metabolites DOPAC and HVA from Striatum of Rats. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY* 38, 95–98 (1997).
30. **Hermida-Ameijeiras A, Méndez-Alvarez E, Sánchez-Iglesias S, Sanmartín-Suárez C, Soto-Otero R.** Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. **Neurochem Int**. 2004 Jul;45(1):103-16.
31. **Wichmann T, DeLong MR.** Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. *Adv Neurol*. 1993;60:53-61.
32. **Giménez-Amaya JM** The association cortex and the basal ganglia: a neuroanatomical view upon their relationship based on hodological studies. **J Hirnforsch**. 1991;32(4):501-10.
33. **Henderson JM, Carpenter K, Cartwright H, Halliday GM.** Degeneration of the centré median-parafascicular complex in Parkinson's disease. **Ann Neurol**. 2000 Mar;47(3):345-52.
34. **CHERKES VA.** FUNCTIONAL RELATIONSHIPS BETWEEN THE NEOSTRIATUM AND GLOBUS PALLIDUM **Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova**. 1964 Dec;50:1409-14.
35. **Mink JW, Thach WT.** Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior. **Curr Opin Neurobiol**. 1993 Dec;3(6):950-7.
36. Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in neurosciences*. 2007; 30:228–235.
37. Hornykiewicz O. The discovery of dopamine in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl* 2006;70:9–15.
38. **Chase TN** Levodopa therapy: consequences of the nonphysiologic replacement of dopamine. **Neurology**. 1998 May;50(5 Suppl 5):S17-25.
39. **Morselli PL, Rizzo M, Tognoni G.** [The therapeutic use of L-DOPA in Parkinson's disease. Biochemical, pharmacological and clinical considerations]. **Recenti Prog Med**. 1970 Feb;48(2):97-124.
40. **O'Connor DT, Frigon RP, Sokoloff RL.** Human catecholamine storage vesicle proteins. **Clin Exp Hypertens A**. 1982;4(4-5):563-75.
41. Robertson DR, Higginson I, Macklin BS, Renwick AG, Waller DG, George CF. The influence of protein containing meals on the pharmacokinetics of levodopa in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 31: 413–417.
42. **Truelle JL, Chanelet J, Bastard J, Six P, Emile J.** [Piribedil, dopaminergic agonist. Prolonged clinical and electrophysiological study in 60 parkinsonian patients (author's transl)]. **Nouv Presse Med**. 1977 Oct 8;6(33):2987-90.
43. **Goetz CG.** Dopaminergic agonists in the treatment of Parkinson's disease. *Neurology*. 1990 Oct;40(10 Suppl 3):suppl 50-4
44. **Goetz CG.** Dopaminergic agonists in the treatment of Parkinson's disease. *Neurology*. 1990 Oct;40(10 Suppl 3):suppl 50-4
45. Bozzi Y, Borrelli E. Dopamine in neurotoxicity and neuroprotection: what do D2 receptors have to do with it? *Trends Neurosci* 2006;29:167–174.

46. Olanow **CW**. A rationale for monoamine oxidase inhibition as neuroprotective therapy for Parkinson's disease. **Mov Disord**. 1993;8 Suppl 1:S1-7.
47. **Ahmad M, Saleem S, Ahmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, Ishrat T, Chaturvedi RK, Agrawal AK, Islam F**. Ginkgo biloba affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: neurobehavioural, neurochemical and immunohistochemical evidences. **J Neurochem**. 2005 Apr;93(1):94-104.
48. **Porsolt RD, Roux S, Drieu K**. Evaluation of a ginkgo biloba extract (EGb 761) in functional tests for monoamine oxidase inhibition. **Arzneimittelforschung**. 2000 Mar;50(3):232-5.
49. **Kobus-Cisowska J, Flaczyk E², Rudzińska M², Kmiecik D²**. Antioxidant properties of extracts from Ginkgo biloba leaves in meatballs. **Meat Sci**. 2014 Jun;97(2):174-80. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.01.011. Epub 2014 Jan 26.
50. Coimbra, C.G.; Junqueira, V.B.C. High doses of riboflavin and the elimination of dietary red meat promote the recovery of some motor functions in Parkinson's disease patients . **Braz J Med Biol Res**, 36(10)1409-1417, 2003
51. Brown EB, Hwang Y-F, Nichol S & Ternberg J (1968). Absorption of radioiron-labeled hemoglobin by dogs. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 72: 58-64.
52. Ryter SW & Tyrrel RM (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 28: 289-309.
53. Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BSS & Kim JJP (1997). Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*, 94: 8411-8416.
54. Sahini VE, Dumitrescu M, Volanschi E, Birla L & Diaconu C (1966). Spectral interferometrical study of the interaction of hemin with glutathione. *Biophysical Chemistry*, 58: 245-253.
55. Shipper HM (2000). Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Experimental Gerontology*, 35: 821-830.
56. Albin RL, Reiner A, Anderson KD, Dure LS 4th, Handelin B, Balfour R, Whetsell WO Jr, Penney JB, Young AB. Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol*. 1992 Apr;31(4):425-30.
57. **Jenkins BG, Koroshetz WJ, Beal MF, Rosen BR**. Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized 1H NMR spectroscopy. **Neurology**. 1993 Dec;43(12):2689-95
58. **Anderson KE, Divino V², DeKoven M², Langbehn D³, Warner JH⁴, Giuliano J⁴, Lee WC²**. Interventional Differences Among Huntington's Disease Patients by Disease Progression in Commercial and Medicaid Populations. **J Huntingtons Dis**. 2014;3(4):355-63. doi: 10.3233/JHD-140124.
59. **Moulton CD, Hopkins CW, Bevan-Jones WR**. Systematic review of pharmacological treatments for depressive symptoms in Huntington's disease. **Mov Disord**. 2014 Oct;29(12):1556-61. doi: 10.1002/mds.25980. Epub 2014 Aug 11.
60. **Stack EC, Dedeoglu A, Smith KM, Cormier K, Kubilus JK, Bogdanov M, Matson WR, Yang L, Jenkins BG, Luthi-Carter R, Kowall NW, Hersch SM, Beal MF, Ferrante RJ**. Neuroprotective effects of synaptic modulation in Huntington's disease R6/2 mice. *J Neurosci*. 2007;27:12908–12915.
61. **Burgunder JM, Guttman M, Perlman S, Goodman N, van Kammen DP, Goodman L**. An International Survey-based Algorithm for the Pharmacologic Treatment of Chorea in Huntington's Disease. Version 2. **PLoS Curr**. 2011 Aug 30 [revised 2011 Oct 11];3:RRN1260.
62. **Marder K, Gu Y, Eberly S, Tanner CM, Scarmeas N, Oakes D, Shoulson I; Huntington Study Group PHAROS Investigators**. Relationship of Mediterranean diet and caloric intake to phenoconversion in Huntington disease. **JAMA Neurol**. 2013 Nov;70(11):1382-8.
63. **Auinger P, Kiebert K, McDermott MP**. The relationship between uric acid levels and Huntington's disease progression. **Mov Disord**. 2010 Jan 30;25(2):224-8.
64. Trejo A, Tarrats RM, Alonso ME, Boll MC, Ochoa A, Velasquez L. Assessment of the nutrition status of patients with Huntington's disease. *Nutrition* 2004;20(2):192–6.

65. **Gomez-Pinedo U, Yáñez M², Matías-Guiu J³, Galán L³, Guerrero-Sola A³, Benito-Martin MS³, Vela A, Arranz-Tagarro JA², García AG².** Cellular changes in motor neuron cell culture produced by cytotoxic cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neurologia.** 2014 Jul-Aug;29(6):346-52
66. **Couthouis J, Raphael AR¹, Daneshjou R¹, Gitler AD¹** Targeted exon capture and sequencing in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **PLoS Genet.** 2014 Oct 9;10(10):e1004704.
67. **Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V.** Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole StudyGroup II. **Lancet.** 1996 May 25;347(9013):1425-31.
68. **Hobbenaghi R, Javanbakht J, Hosseini E, Mohammadi S, Rajabian M, Moayeri P, Aghamohammad Hassan M.** Neuropathological and neuroprotective features of vitamin B12 on the dorsal spinal ganglion of rats after the experimental crush of sciatic nerve: an experimental study. **Diagn Pathol.** 2013 Jul 31;8:123
69. **Kaji R, Kodama M, Imamura A, Hashida T, Kohara N, Ishizu M, Inui K, Kimura J.** Effect of ultrahigh-dose methylcobalamin on compound muscle action potentials in amyotrophic lateral sclerosis: a double-blind controlled study. **Muscle Nerve.** 1998 Dec;21(12):1775-8.
70. **Selkoe DJ.** The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. **Trends Cell Biol.** 1998 Nov;8(11):447-53.
71. **Li Q, Südhof TC.** Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. **J Biol Chem.** 2004 Mar 12;279(11):10542-50. Epub 2003 Dec 29.
72. **Matsushita T, Shimohama S.** Nucleus basalis of Meynert and cholinergic neurotransmission. **Nihon Rinsho.** 2011 Oct;69 Suppl 8:210-3
73. **Chatellier G, Lacomblez L.** Tacrine (tetrahydroaminoacridine; THA) and lecithin in senile dementia of the Alzheimer type: a multicentre trial. Groupe Français d'Etude de la Tetrahydroaminoacridine. **BMJ.** 1990 Feb 24;300(6723):495-9.
74. **Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, Friedland RP, Galasko D, Hall K, Luchsinger JA, Ogunniyi A, Perry EK, Potocnik F, Prince M, Stewart R, Wimo A, Zhang ZX, Antuono P.** Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. **Lancet Neurol.** 2008; 7:812–826.
75. **Kim, H.J., Rowe, M., Ren M, Hong JS, Chen PS, Chuang DM.** Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. **J Pharmacol Exp Ther.** 2007 Jun;321(3):892-901. Epub 2007 Mar 19.
76. **Agrawal SS, Gullaiya S, Dubey V, Singh V, Kumar A, Nagar A, Tiwari P.** Neurodegenerative Shielding by Curcumin and Its Derivatives on Brain Lesions Induced by 6-OHDA Model of Parkinson's Disease in Albino Wistar Rats. **Cardiovasc Psychiatry Neurol.** 2012;2012:942981

ANEXO I



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50570-620 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
Fax: (55 81) 2126 8360
www.ccb.ufpe.br

Recife, 05 de maio de 2014.

Ofício nº 16/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Raul Manhães de Castro**
Departamento de Nutrição – CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.033268/2013-72

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Análise da interação de receptores nucleares hipotalâmicos nas desordens metabólicas induzidas pela desnutrição protéica perinatal."**

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Peso: 380-430g; Idade: 180 dias; sexo: machos; Número total de animais previsto no protocolo: 96.

Atenciosamente,

Profª Maria Vasconcelos
Vice-Presidente da CEUA-UFPE
SAPE 218935

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO II

● Enc: Hormone and Metabolic Research - Decision on Manuscript ID HMR-2016-12-0388

[Pessoas](#) ¹

Dear Prof. Castro,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Peripheral and central glucocorticoid signaling contributes to positive energy balance in rats / Glucocorticoids and energy balance" in its resubmitted form for publication in Hormone and Metabolic Research.

You find your manuscript as well as this decision letter in your Author Center under Manuscripts with Decisions.

Your manuscript will be forwarded to Georg Thieme Publishers. They will prepare your manuscript for online and print publication. Thieme will contact you in the next weeks for further details.

Thank you for your contribution. Also on behalf of the Editors of Hormone and Metabolic Research, we look forward to your continued cooperation with the journal.

Yours sincerely,
Matthias Schott, MD, PhD
Editor-in-Chief
Hormone and Metabolic Research
E-mail: hmr@thieme.de
