

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO NALTREXONA/BUPROPIONA SOBRE A
VIA DOPAMINÉRGICA DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM
RATOS *WISTAR* OBESOS

GILVANILDO ROBERTO DA SILVA

Recife
2018

GILVANILDO ROBERTO DA SILVA

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO NALTREXONA/BUPROPIONA SOBRE A
VIA DOPAMINÉRGICA DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM
RATOS *WISTAR* OBESOS**

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.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Lopes de Souza

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

**Recife
2018**

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

S586e Silva, Gilvanildo Roberto da.
Efeitos da associação naltrexona/bupropina sobre a via dopaminérgica do comportamento alimentar em ratos wistar obesos / Gilvanildo Roberto da Silva. – 2018.
108 f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Sandra Lopes de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, 2018.
Inclui Referências e anexos.

1. Naltrexona. 2. Bupropiona. 3. Receptores Dopaminérgicos. 4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. I. Souza, Sandra Lopes de. (Orientadora). II. Título.

616.8 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2018-91)

GILVANILDO ROBERTO DA SILVA

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO NALTREXONA/BUPROPIONA SOBRE A
VIA DOPAMINÉRGICA DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM
RATOS *WISTAR* OBESOS**

Aprovada em: 28/02/2018

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.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra Rhowena Jane Barbosa de Matos
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE/CAV

Prof^a Dra Amanda Alves Marcelino da Silva
Universidade de Pernambuco - UPE

Prof^a Dra Maria da Conceição Cavalcanti de Lira
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/CAV

Prof^a Dra Liriane Baratella Evêncio
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a Dra Matilde Cesiana da Silva
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/CAV

Dedico este trabalho aos pilares da minha vida...

À minha querida e amada mãe Raquel de Lima Silva, meu porto seguro sempre.

A ela tudo que fui, sou e serei.

À minha filhota Aisha Gabriella Silva Queiroz, minha primogênita, pelo amor incondicional.

Aos meus filhotes Gabriel Roberto Ferreira Silva e Gustavo Roberto Ferreira Silva.

À minha querida esposa Shirley da Silva Ferreira, pelo apoio, paciência e companheirismo.

Obrigado por existirem em minha vida

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus

Primeiramente pela oportunidade de ter chegado até aqui e por ter feito minha vida valer à pena!

À professora Manuela Figueiroa

Pela disponibilidade, paciência e competência na co-orientação deste trabalho. Por todo conhecimento transmitido e pelas preciosas contribuições. Pelas horas de dedicação na elaboração do pré-projeto até a sua concretização. Pelas vezes que liguei ou mandei e-mail e ela tão gentilmente me atendeu. Pelos esclarecimentos e incentivos, pela confiança depositada na minha pessoa e no meu trabalho. Pelas palavras de apoio, pelas oportunidades, pelos conselhos e sua preocupação comigo. Por saber enxergar bem as pessoas e ver o que há de melhor nelas... Mas do que orientadora, és uma amiga sempre presente. Seus atos, seus gestos, sua competência, sua inteligência, sua humildade, sua amizade e simpatia, revela a essência de uma professora exemplar, detentora de um caráter excepcional, e uma sensibilidade que é peculiar aos que possuem um grande coração. Obrigado por tudo e principalmente por ter tornado o meu sonho realidade.

À professora Sandra Lopes de Souza

Pela preciosa orientação e por todo empenho e dedicação nos vários momentos do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia

Pelo uso dos laboratórios de histoquímica, imunohistoquímica e microscopia, bem como aos técnicos Arthur e Silvana pelo inestimado apoio nas etapas dos experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento

Pela alegria proporcionada de ser selecionado para fazer parte da turma do doutorado 2014, bem como pela qualidade do programa oferecido e por todo apoio e incentivo concedido para concretização do mesmo.

Ao Depto de Anatomia

Em especial, pelo uso do biotério, pela estrutura física e demais recursos disponibilizados para viabilização deste trabalho. Ao Dr. Waldo, veterinário do biotério do anexo do depto de anatomia, pelo apoio, ensinamentos e cuidado profissional com os animais alojados no biotério, utilizados nesta pesquisa.

.

Ao Depto de Nutrição

Especialmente a Prof^{ra}. Dr^a. Elisabeth pela contribuição na confecção das dietas experimentais e Edeones França, veterinário que teve participação impar na obtenção e cuidado com os animais utilizados neste trabalho.

À Professora Rhowena Matos

Pela valiosa contribuição, gentilmente dedicada através do seu precioso tempo e esforço no processamento das análises das amostras, durante a realização do processo da qPCR, e pela transmissão de conhecimentos e esclarecimentos acerca do tema.

Aos estagiários

Marianne, Miriam, Ana Clara, Jaciane e Emanuelle, pela parceria nos experimentos, pelas exaustivas horas no biotério, pela responsabilidade, dedicação e comprometimento fundamental para realização deste trabalho.

Aos colegas de turma

Em especial aqueles com quem convivi mais de perto, espero que possamos manter nossa amizade, e que todos possam ser recompensados por este título, de conquista tão difícil, ao mesmo tempo que compensador, e que compartilhem dele da forma mais altruísta possível com os que os cercam, pois daí vem o seu verdadeiro valor.

A Facepe

À Fundação de Amparo Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro através do edital N° APQ-0729-4.01/15 que foi essencial para realização desta pesquisa.

*“Ninguém ignora tudo.
Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre. ”*

Paulo Freire

RESUMO

A obesidade tem sido relacionada ao maior consumo alimentar e a alterações nos mecanismos neurais do controle do comportamento, porém os mecanismos moleculares, celulares e comportamentais, ainda são pouco esclarecidos. Postula-se que a dopamina participa desses mecanismos através da ação dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂. Estudos sobre processos reguladores de homeostase energética têm colaborado para o desenvolvimento de novos fármacos contra a fisiopatologia da obesidade. A terapia combinada de naltrexona e bupropiona (NAL/BUP) tem sido alvo de muitos estudos por atuar causando a perda de peso. Nesse estudo, o objetivo foi investigar os efeitos do uso combinado de NAL/BUP sobre a via dopaminérgica do comportamento alimentar em ratos obesos. Ratos da linhagem *wistar*, mantidos em condições padrões de biotério, foram distribuídos em dois grupos de acordo com a dieta oferecida: n=20 normonutrido (dieta padrão) e n=20 obeso (dieta de cafeteria). Foram analisados: peso corporal; consumo alimentar; índice de Lee; índice de massa corporal (IMC); perfil glicêmico; preferência alimentar; sequência comportamental de saciedade (SCS); perfil bioquímico; perfil hematológico; massa relativa do fígado, rins, gordura perigonadal e gordura abdominal; expressão gênica da tirosina hidroxilase e dos receptores DRD_{1a} e DRD₂. Com base nessas avaliações, o uso combinado de NAL/BUP reduziu o peso corporal ($418,4 \pm 43,7$ vs. $461,5 \pm 38,1$), reduziu o consumo alimentar ($4,25 \pm 0,23$ vs. $5,74 \pm 0,36$); reduziu o consumo e a preferência por carboidratos ($3,42 \pm 0,59$ vs. $5,60 \pm 0,46$) e de lipídeos ($2,95 \pm 0,51$ vs. $4,97 \pm 0,40$); antecipou o disparo da saciedade e reduziu a ingestão alimentar ($0,60 \pm 0,88$ vs. $3,25 \pm 1,67$) e a duração da alimentação ($154,13 \pm 187,63$ vs. $851,00 \pm 425,00$) e aumentou o tempo de duração do descanso ($1862,38 \pm 589,63$ vs. $818,25 \pm 799,78$) mantendo a taxa local e global de alimentação inalteradas ($p > 0,05$). Além disso, reduziu o índice de Lee ($321,7 \pm 12,2$ vs. $344,4 \pm 13,7$) e o IMC ($0,91 \pm 0,07$ vs. $0,77 \pm 0,08$), não alterando a taxa de glicose ($105,75 \pm 11,16$ vs. $99,50 \pm 10,38$). Aumentou o peso relativo do fígado ($3,76 \pm 0,84$ vs. $2,64 \pm 0,33$) e reduziu a gordura perigonadal ($3,64 \pm 0,66$ vs. $4,36 \pm 0,56$), e gordura abdominal ($2,83 \pm 1,16$ vs. $4,06 \pm 0,52$). Aumentou a fosfatase alcalina ($303,09 \pm 0,39$ vs. $213 \pm 27,10$); a enzima AST ($228,27 \pm 17,92$ vs. $159,05 \pm 8,49$) e as plaquetas ($528,40 \pm 251,02$ vs. $405,70 \pm 159,99$); e reduziu a glicemia ($143,10 \pm 7,81$ vs. $198,07 \pm 12,16$). Aumentou a expressão de TH ($1,81 \pm 0,13$ vs. $0,90 \pm 0,23$) e DRD₂ ($2,37 \pm 0,44$ vs. $1,05 \pm 0,69$) no núcleo *accumbens* e estriado, não alterando DRD_{1a} ($0,96 \pm 0,47$ vs. $0,89 \pm 0,48$). Estes resultados indicam que o uso combinado de NAL/BUP promove alterações na via dopaminérgica do comportamento alimentar, aumentando os níveis de expressão de TH e de DRD₂, reduzindo o consumo de alimentos desamente energéticos o que contribui para a perda de peso, além de melhoria na glicemia.

Palavras-Chave: Obesidade. Naltrexona. Bupropiona. Receptores dopaminérgicos. Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real.

ABSTRACT

Obesity has been related to higher food consumption and changes in the neural mechanisms of behavior control, but the molecular mechanisms, cellular and behavioral, are still unclear. It is postulated that dopamine participates in these mechanisms through the action of dopaminergic D1 and D2 receptors. Studies on energy homeostasis regulating processes have contributed to the development of new drugs against the pathophysiology of obesity. Combination therapy of naltrexone and bupropion (NAL / BUP) has been the target of many studies for acting to cause weight loss. In this study, the objective was to investigate the effects of the combined use of NAL/BUP on the dopaminergic pathway of food behavior in obese rats. Wistar rats, kept under standard animal husbandry conditions, were divided into two groups according to the diet offered: n = 20 normonutritive (standard diet) and n = 20 obese (cafeteria diet). Body weight; food consumption; Lee index; body mass index (BMI); glycemic profile; food preference; behavioral satiety sequence (BSS); biochemical profile; hematological profile; relative liver mass, kidneys, perigonadal fat and abdominal fat; gene expression of tyrosine hydroxylase and DRD_{1a} and DRD₂ receptors. Based on these evaluations, the combined use of NAL/BUP reduced body weight (418.4 ± 43.7 vs. 461.5 ± 38.1), reduced food intake (4.25 ± 0.23 vs. 5.74 ± 0.36); reduced consumption and preference for carbohydrates (3.42 ± 0.59 vs. 5.60 ± 0.46) and lipids (2.95 ± 0.51 vs. 4.97 ± 0.40); anticipated the release of satiety and reduced food intake (0.60 ± 0.88 vs. 3.25 ± 1.67) and feeding duration (154.13 ± 187.63 vs. 851.00 ± 425.00) and increased duration of rest (1862.38 ± 589.63 vs. 818.25 ± 799.78), maintaining the local and global feeding rate unchanged ($p > 0.05$). In addition, it reduced the Lee index (321.7 ± 12.2 vs. 344.4 ± 13.7) and the BMI (0.91 ± 0.07 vs. 0.77 ± 0.08), without altering the rate of glucose (105.75 ± 11.16 vs. 99.50 ± 10.38). It increased liver relative weight (3.76 ± 0.84 vs. 2.64 ± 0.33) and reduced perigon fat (3.64 ± 0.66 vs. 4.36 ± 0.56), and abdominal fat (2.83 ± 1.16 vs. 4.06 ± 0.52). Alkaline phosphatase increased (303.09 ± 0.39 vs. 213 ± 27.10); the AST enzyme (228.27 ± 17.92 vs. 159.05 ± 8.49) and platelets (528.40 ± 251.02 vs. 405.70 ± 159.99); and reduced blood glucose (143.10 ± 7.81 vs. 198.07 ± 12.16). Increased expression of TH (1.81 ± 0.13 vs. 0.90 ± 0.23) and DRD₂ (2.37 ± 0.44 vs. 1.05 ± 0.69) in the nucleus accumbens and striatum, without altering DRD_{1a} (0.96 ± 0.47 vs. 0.89 ± 0.48). These results indicate that the combined use of NAL/BUP promotes changes in the dopaminergic pathway of food behavior, increasing the levels of TH and DRD₂ expression, reducing the consumption of non-energy foods, which contributes to weight loss, as well as improvement on blood glucose.

Key words: Obesity. Naltrexone. Bupropion. Receptors, Dopamine. Real Time PCR.

LISTAS DE FIGURAS

Listas de figuras da Tese

Figura 1 – Prevalência mundial do sobrepeso em homens maiores de 18 anos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) de acordo com a World Health Organization, ano de referência: 2016.....	18
Figura 2 – Prevalência mundial do sobrepeso em mulheres maiores de 18 anos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) de acordo com a World Health Organization, ano de referência: 2016.....	19
Figura 3 – Prevalência mundial da obesidade em homens maiores de 18 anos de idade ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) de acordo com a World Health Organization, ano de referência: 2016.....	20
Figura 4 – Prevalência mundial da obesidade em mulheres maiores de 18 anos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) de acordo com a World Health Organization, ano de referência: 2016.....	21
Figura 5 – Síntese da dopamina	28
Figura 6 – Terminal de um neurônio dopaminérgico mostrando a síntese da dopamina	29
Figura 7 – Principais vias dopaminérgicas do encéfalo de humanos	30
Figura 8 – Mecanismo de ação da associação de NAL/BUP sobre a perda de peso	36
Figura 9 – Organograma demonstrando a formação dos grupos experimentais	41
Figura 10 – Efeito da combinação NAL/BUP sobre a glicemia	84
Figura 11 – Efeito da combinação NAL/BUP sobre a massa relativa do fígado e rins	85

Listas de figuras do artigo original

Figura 1 – Evolução do peso corporal durante 11 semanas antes do tratamento	76
Figura 2 – Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre o peso corporal durante 14 dias de tratamento	76
Figura 3 – Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre o consumo alimentar (Kcal/g) durante 14 dias de tratamento	77

Figura 4 – Índice de Lee realizado antes e após tratamento pela associação NAL/BUP	78
Figura 5 – Índice de Massa corporal (IMC) realizado antes e após tratamento pela associação NAL/BUP	78
Figura 6 - Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre a preferência por proteínas, carboidratos e lipídeos.....	79
Figura 7 - Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre a sequência comportamental de saciedade	80
Figura 8 - Efeitos do uso combinado de NAL/BUP sobre a massa relativa da gordura perigonadal (A) e Gordura abdominal	80
Figura 9 - Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre a expressão gênica da tirosina hidroxilase (TH), DRD _{1a} e DRD ₂ em relação a β -actina	81

LISTAS DE TABELAS

Listas de tabelas da Tese

Tabela 1 – Classificação internacional da obesidade segundo o índice de massa corporal (IMC) e risco de doença (Organização Mundial da Saúde)	24
Tabela 2 – Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta padrão de biotério (normocalórica) oferecida aos animais experimentais	42
Tabela 3 – Ingredientes da dieta ocidentalizada utilizada nos experimentos	42
Tabela 4 – Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta de cafeteria oferecida aos animais experimentais	43
Tabela 5 – Efeito da combinação de NAL/BUP sobre o perfil bioquímico em ratos normonutridos e obesos.....	86
Tabela 6 – Efeito da combinação de NAL/BUP sobre o perfil hematológico em ratos normonutridos e obesos.....	87

Listas de tabelas do artigo original

Tabela 1 – Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta padrão de biotério (normocalórica) oferecida aos animais experimentais	82
Tabela 2 – Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta de cafeteria oferecida aos animais experimentais	82
Tabela 3 – Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta hiperpalatável (Cookie chocolate) oferecida aos animais experimentais	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MSH α -Melanocyte-stimulating hormone (Hormônio estimulante de alfa – melanócitos)

AC Adenilato ciclase

AMPc Monofosfato de adenosina cíclico

ATP Adenosina Trifosfato

β -actina Beta Actina

BH4 Tetrahidrobioterina

BUP Bupropiona

CCS Centro de Ciências da Saúde

CEEa Comissão de Ética em Experimentação Animal

cDNA Complementary DNA (DNA complementar)

CKK colecistocinina

COMT Catecol-O-Metiltransferase

Ct Threshold cycle (Ciclo limiar)

DCND Doenças crônicas não-degenerativas

DA Dopamina

DM Diabetes *mellitus*

DARPP-32 Fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc

DAT Dopamine Transporter (Transportador de Dopamina)

DRD1 Receptor de dopamina do tipo 1

DRD2 Receptor de dopamina do tipo 2

DNA Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DOPAC ácido diidroxifenilacético

EUA Estados Unidos da América

FAO Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

GDP Guanosina difosfato

G_i Proteínas G, do tipo inibitória

G_s Proteínas G, do tipo excitatória

GTP Guanosina trifosfato

HDL High Density Lipoprotein (Lipoproteína de alta densidade)

HVA ácido homovanílico

LDL Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade)

L-Dopa Levodopa

MAO Monoamina Oxidase

mRNA Messenger Ribonucleic Acid (RNA mensageiro)

3-MT 3- metoxitiramina

NA Noradrenalina

NAc Núcleo *Accumbens*

NAL Naltrexona

NAL/BUP Associação naltrexona e bupropiona

NCT Normonutrido com tratamento pela associação de NAL/BUP

NPY Neuropeptídeo Y

NST Normonutrido sem tratamento pela associação de NAL/BUP

OCT Obeso com tratamento pela associação de NAL/BUP

OMS Organização Mundial de Saúde

OPAS Organização Pan-americana de Saúde

OST Obeso sem tratamento pela associação de NAL/BUP

POMC Peptídeo pró-ópiomelancortina

PCR Polymerase Chain Reaction (Cadeia de reação em polimerase)

RNA Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)

qPCR Polymerase chain reaction quantitative real time (PCR quantitativo em tempo real)

SCS Sequência Comportamental de saciedade

SNC Sistema Nervoso Central

SBCAL Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

TH Tirosina Hidroxilase

UNICEF United Nations Children's Foundation (Fundo das Nações Unidas para a Infância)

UFPE Universidade Federal de Pernambuco

VIGITEL Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

PKA Proteinocinases A

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 OBESIDADE	19
2.1.1 Conceito	19
2.1.2 Epidemiologia da obesidade	19
2.1.2.1 Prevalência da obesidade no mundo	19
2.1.2.2 Prevalência da obesidade no Brasil	23
2.1.3 Causas da obesidade	23
2.1.4 Classificação da obesidade segundo o índice de massa corporal (IMC)	25
2.1.5 Consequências da obesidade	26
2.1.5.1 Consequências da obesidade relacionadas a saúde	26
2.1.5.2 Consequências econômicas da obesidade	26
2.2 SISTEMA DOPAMINÉRGICO	29
2.2.1 Dopamina	28
2.2.2 Síntese da dopamina	28
2.2.3 Armazenamento da dopamina	29
2.2.4 Liberação e recaptação da dopamina	30
2.2.5 Catabolismo e inativação da dopamina	31
2.2.6 Vias dopaminérgicas	31
2.2.7 Receptores dopaminérgicos	32
2.2.8 Receptor dopaminérgico D1	32
2.2.9 Receptor dopaminérgico D2	33
2.2.10 Receptor dopaminérgico D3	33
2.2.11 Receptor dopaminérgico D4	33
2.2.12 Receptor dopaminérgico D5	34
2.3 COMPORTAMENTO ALIMENTAR	34
2.4 TRATAMENTOS DA OBESIDADE	35
2.4.1 Tratamento não farmacológico da obesidade	36
2.4.2 Tratamento farmacológico da obesidade	36
2.4.3 Associação naltrexona/bupropiona no tratamento da obesidade	37
3 HIPÓTESES	39

4 OBJETIVOS	40
4.1. OBJETIVO GERAL	40
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
5 MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	41
5.2 OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
5.3 DIETAS EXPERIMENTAIS	42
5.4 EXPERIMENTOS	44
5.4.1 Análise da evolução ponderal	44
5.4.2 Análise do consumo alimentar antes do tratamento	44
5.4.3 Efeito da combinação NAL/BUP sobre o consumo alimentar	45
5.4.4 Efeito da combinação NAL/BUP sobre o índice de Lee	45
5.4.5 Efeito da combinação NAL/BUP sobre o índice de massa corporal (IMC)	46
5.4.6 Efeito da combinação NAL/BUP sobre a preferência a macronutrientes	46
5.4.7 Efeito da combinação NAL/BUP sobre a sequência comportamental de saciedade (SCS)	46
5.5 ESTUDOS	47
5.5.1 Efeito da combinação NAL/BUP sobre a glicemia capilar	47
5.5.2 Efeito da combinação NAL/BUP sobre a massa relativa do fígado, rins, gordura abdominal e perigonadal	47
5.5.3 Efeito da combinação NAL/BUP sobre o perfil bioquímico	48
5.5.4 Efeito da combinação NAL/BUP sobre o perfil hematológico	48
5.5.5 Efeito da combinação NAL/BUP sobre a expressão gênica da enzima TH, DRD _{1a} e DRD ₂ no núcleo <i>accumbens</i> e estriado	48
5.6 MÉTODOS DE ANÁLISES	49
5.7 ASPECTOS ÉTICOS	49
6 RESULTADOS (Artigo original)	50
7 RESULTADOS SUPLEMENTARES	85
8 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS SUPLEMENTARES	89
9 PERSPECTIVAS	92
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXO A - Ofício da Comissão de Ética em Experimentação Animal – CCS/UFPE	108

1 INTRODUÇÃO

A obesidade tornou-se uma doença universal de prevalência crescente e que vem adquirindo proporções alarmantes, sendo um dos principais problemas de saúde pública da sociedade moderna, que atinge indivíduos de todos os sexos, faixas etárias e níveis socioeconômicos (BARBIERI, 2011; SOUSA et al, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), sobrepeso e obesidade é definida como acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, que apresenta um risco para a saúde e são fatores de risco importantes para uma série de doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer.

Uma vez considerado um problema apenas em países de alta renda, o excesso de peso e a obesidade agora estão aumentando dramaticamente nos países de baixa e média renda, particularmente nas áreas urbanas (WHO, 2017). Nos dias atuais, junto à globalização, vem sendo modificado, também, o estilo de vida dos indivíduos para um tipo mais moderno, conhecido como estilo de vida ocidental e com isso, está ocorrendo uma mudança no padrão alimentar. Essa alteração está resultando no aumento da alimentação consumida fora de casa, em estabelecimentos onde o preparo e o consumo são rápidos e os alimentos possuem alta palatabilidade (CASTRO et al, 2015; SAKURAI et al, 2016).

Pesquisas indicam relações entre o consumo de alimentos e a liberação de neurotransmissores em estruturas do sistema nervoso central. Dentre os sistemas neurais responsáveis pela ingestão dos alimentos, destaca-se a via dopaminérgica mesolímbica que, por ação da dopamina (DA), impulsiona comportamentos gratificantes, como a alimentação (O'RAHILLY, 2009; RAO et al., 2014). Os receptores dopaminérgicos D1 atuam influenciando a motivação do apetite e estimulando o indivíduo a ingerir mais alimentos. Por outro lado, os receptores D2 atuam inibindo o consumo de alimentos, e estão relacionados à saciedade ao invés da motivação. Estas duas classes de receptores são expressas particularmente no núcleo *accumbens*, estriado, hipotálamo e córtex (WANG, 2001; ROBINSON, 2005; VUCETIC et al, 2010; BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011).

Uma vez que a DA modula o comportamento emocional e motivacional, anormalidades em suas vias de sinalização podem desencadear comportamentos patológicos, como a ingestão exagerada de alimentos ou vício em certas substâncias (ARIAS-CARRIÓN et al., 2010; BAIK, 2013). Em estados patológicos, como na obesidade, parece existir menor capacidade de sinalização do sistema dopaminérgico, entretanto, o controle dopaminérgico do comportamento alimentar em indivíduos obesos permanece pouco compreendido (WANG, 2001; HALTIA, 2007). Estudos recentes sobre processos reguladores de homeostase energética têm colaborado

para o desenvolvimento de novos fármacos contra a fisiopatologia da obesidade. Dentre as principais drogas eficazes, a terapia combinada de naltrexona e bupropiona tem sido alvo de inúmeros estudos por atuar causando a perda de peso (WADDEN et al, 2011, CLAPPER et al, 2013).

A bupropiona é um inibidor da recaptação de dopamina e norepinefrina, atualmente aprovado para tratamento de depressão e como coadjuvante da cessação do tabagismo e a naltrexona é um antagonista de receptor opióide inicialmente aprovado como tratamento da dependência aos opiáceos e, posteriormente, da dependência ao álcool. Esta associação mostrou ter um efeito chamado sinérgico, ou seja, maior do que a soma dos efeitos observados de cada medicação na perda de peso. A associação parece ainda atuar nos mecanismos cerebrais de prazer e recompensa que atualmente sabemos estar cada vez mais implicados no comportamento alimentar (PADWAL, 2009, GREENWAY et al, 2010, WADDEN et al, 2011). A despeito de essas drogas apresentarem uma eficácia discreta, quando utilizadas isoladamente, o entendimento atual das complexas vias de regulação central e periférica do apetite permitiu que se postulasse um efeito sinérgico da sua associação (SIMPSON et al, 2009).

Portanto, diante da alta prevalência da obesidade e doenças relacionadas, e dos elevados gastos com tratamentos de saúde devido a obesidade e a carência de tratamentos farmacológicos seguros e eficazes, esta pesquisa teve como finalidade investigar o efeito do uso combinado de naltrexona/bupropiona sobre a via dopaminérgica do comportamento alimentar em ratos Wistar obesos, embora tratamento de mais longo prazo possam trazer informações adicionais sobre os benefícios desta associação, os resultados obtidos neste trabalho representam uma importante contribuição na abordagem medicamentosa da obesidade, sobretudo em indivíduos pouco responsivos à terapêutica usual.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OBESIDADE

2.1.1 Conceito:

A Organização Mundial de Saúde (OMS), define sobrepeso e obesidade como acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, resultante do desequilíbrio energético prolongado, que pode ser causado pelo excesso de consumo de calorias e/ou inatividade física e que representa um risco para a saúde. Em adultos, a OMS define o excesso de peso como tendo um índice de massa corporal (IMC) de $\geq 25,0 \text{ kg/m}^2$, a obesidade como tendo uma IMC de $\geq 30,0 \text{ kg/m}^2$ e sobrepeso como tendo um IMC de $25,0\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$. O excesso de peso, portanto, inclui sobrepeso e obesidade (CDC; WHO 2017).

2.1.2 Epidemiologia da obesidade

2.1.2.1 Prevalência da obesidade no mundo

Segundo dados atuais da Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência mundial de obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016. Em 2016, estimou-se que mais de 1,9 bilhão de adultos maiores de 18 anos tinham excesso de peso (Figuras 1 e 2).

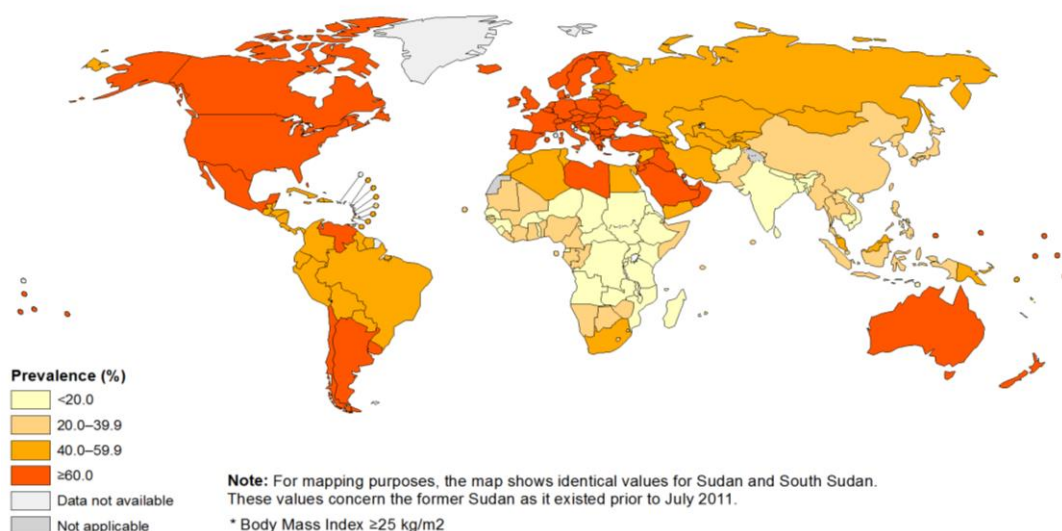


Figura 1. Prevalência mundial do sobrepeso em homens maiores de 18 anos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) de acordo com a World Health Organization, ano de referência: 2016. (WHO, 2017).

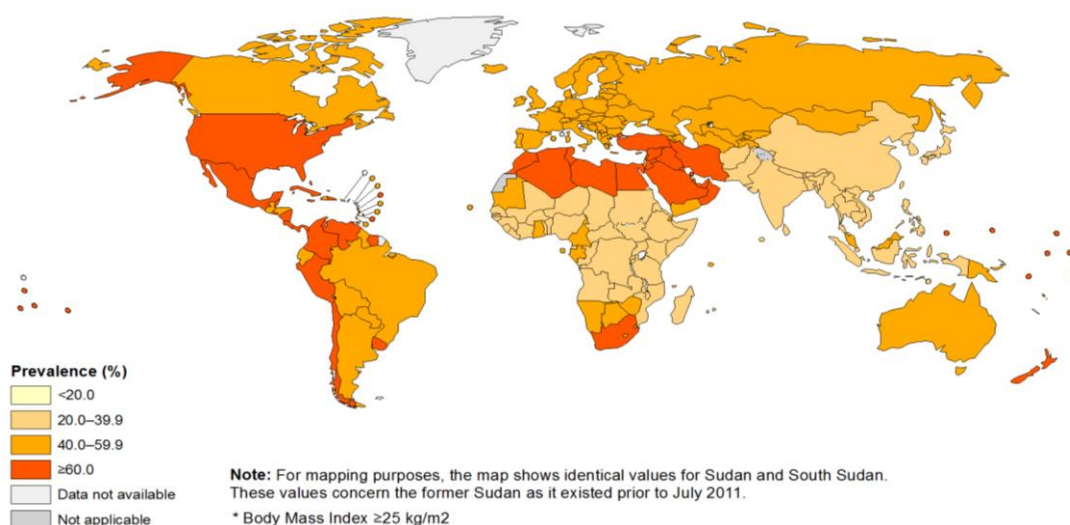


Figura 2. Prevalência mundial do sobrepeso em mulheres maiores de 18 anos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) de acordo com a World Health Organization, ano de referência: 2016. (WHO, 2017)

Em 1975 pouco menos de 1% das crianças e adolescentes de 5 a 19 anos eram obesos, enquanto em 2016 mais de 124 milhões de crianças e adolescentes (6% das meninas e 8% dos meninos) eram obesos (WHO, 2017). Destes, mais de 650 milhões de adultos eram obesos (Figuras 2, 3). 39% dos adultos com idade igual ou superior a 18 anos apresentavam sobrepeso em 2016 e 13% eram obesos. Em 2016, estimou-se que 41 milhões de crianças menores de 5 anos tinham excesso de peso ou obesidade. Em 2016, mais de 340 milhões de crianças e adolescentes de 5 a 19 anos tinham sobrepeso ou obesidade, aumentando dramaticamente a prevalência de apenas 4% em 1975 para pouco mais de 18% em 2016. Uma vez considerado um problema de país de alta renda, o excesso de peso e a obesidade estão agora a aumentar nos países de baixa e média renda, particularmente em ambientes urbanos. Na África, o número de crianças com sobrepeso com menos de 5 anos aumentou quase 50 por cento desde 2000. Quase metade das crianças com menos de 5 anos com excesso de peso ou obesidade em 2016 moravam na Ásia (WHO, 2017).

O excesso de peso e a obesidade estão ligados a mais mortes em todo o mundo do que a insuficiência ponderal. Globalmente, há mais pessoas que são obesas do que o sobrepeso - isso ocorre em todas as regiões, exceto em partes da África subsaariana e da Ásia (WHO, 2017).

A obesidade e o excesso de peso assumiram proporções epidêmicas na região das Américas, que agora tem a maior prevalência de todas as regiões da Organização Mundial da Saúde: 62% dos adultos têm sobrepeso ou obesidade. Esta epidemia não poupou crianças e adolescentes e 20% a 25% são afetadas por excesso de peso ou obesidade (WHO, 2017).

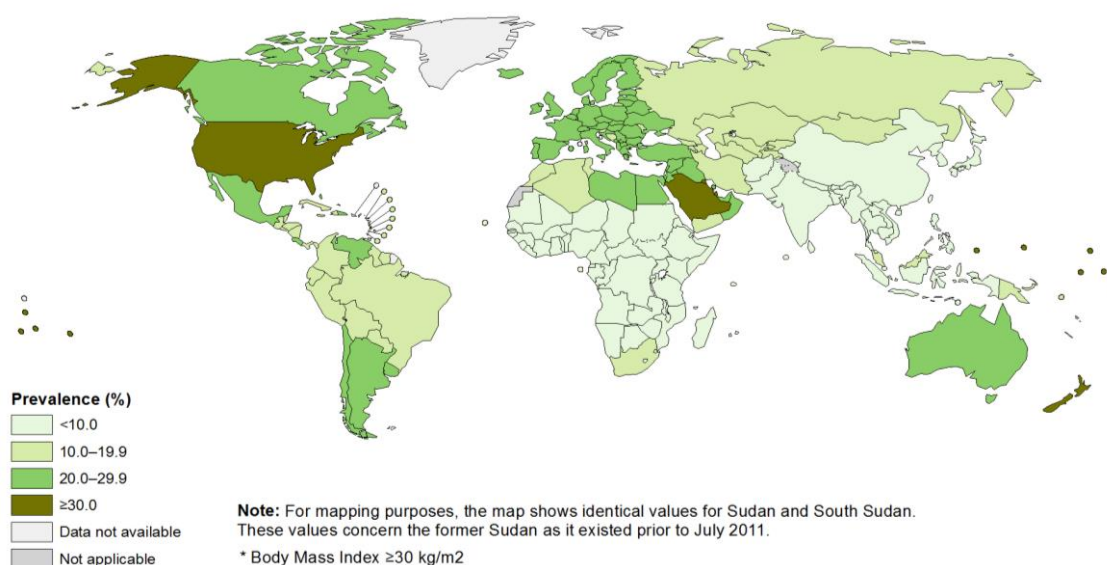


Figura 3. Prevalência mundial da obesidade em homens maiores de 18 anos de idade ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) de acordo com a World Health Organization, ano de referência: 2016. (WHO, 2017).

Nos Estados Unidos (EUA), a prevalência de obesidade foi de 36,5% (estimativa bruta) entre adultos durante 2011-2014. No geral, a prevalência de obesidade entre as mulheres (38,3%) foi maior que entre os homens. Para crianças e adolescentes com idades entre 2-19 anos a prevalência de obesidade permaneceu bastante estável em cerca de 17% e afetou cerca de 12,7 milhões de crianças e adolescentes. (34,3%) (CYNTHIA et al, 2015).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), a obesidade e o sobrepeso vêm aumentando em toda a América Latina e Caribe, com um impacto maior nas mulheres e uma tendência de crescimento nas crianças. De acordo relatório conjunto – Panorama da Segurança Alimentar e Nutricional na América Latina e Caribe, 58% da população latino-americana e caribenha estão com sobrepeso (360 milhões de pessoas). Salvos Haiti (38,5%), Paraguai (48,5%) e Nicarágua (49,4%), o sobrepeso afeta a mais da metade da população de todos os países da região, sendo Chile (63%), México (64%) e Bahamas (69%) os que registram as taxas mais altas (OPAS; OMS, 2017). A obesidade afeta a 140 milhões de pessoas, 23% da população regional e as maiores prevalências são observadas em todos os países do Caribe: Bahamas (36,2%) Barbados (31,3%), Trinidad e Tobago (31,1%) e Antígua e Barbuda (30,9%). O aumento da obesidade impacta de maneira desproporcionada as mulheres. Em mais de 20 países da América Latina e Caribe, a taxa de obesidade feminina é 10% maior que a dos homens (OPAS; OMS, 2017).

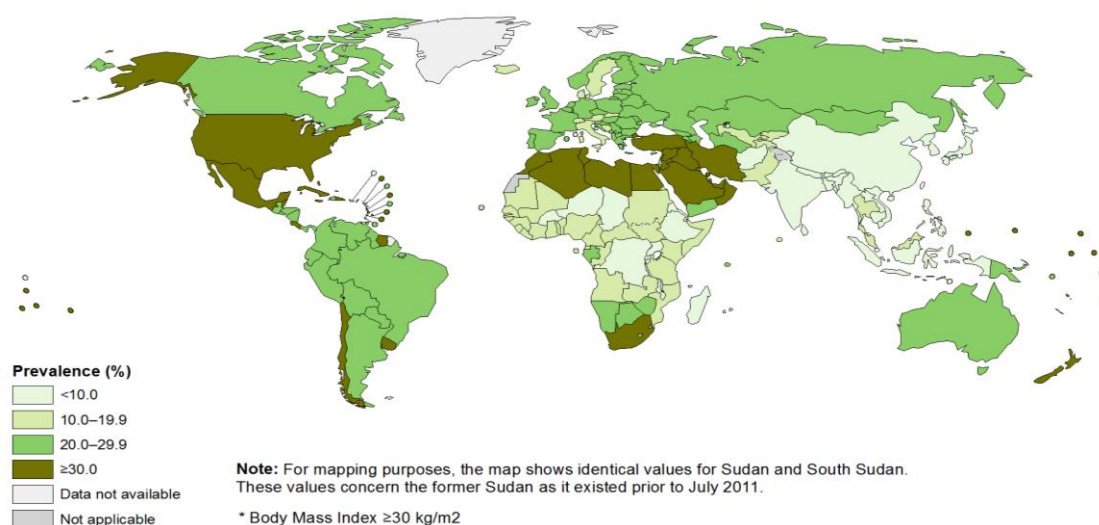


Figura 4. Prevalência mundial da obesidade em mulheres maiores de 18 anos de idade (IMC ≥ 30 kg/m²) de acordo com a World Health Organization, ano de referência: 2016. (WHO, 2017).

O Panorama aponta que na América Latina e Caribe, 7,2% das crianças menores de cinco anos estão com sobrepeso, o que representa um total de 3,9 milhões de crianças, sendo que 2,5 milhões moram na América do Sul, 1,1 milhão na América Central e 200 mil no Caribe.

As taxas mais elevadas de sobrepeso infantil entre 1990 e 2015 foram registradas – em números totais – na América Central (onde a taxa cresceu de 5,1% para 7%). O maior aumento na prevalência foi registrado no Caribe (cuja taxa aumentou de 4,3% a 6,8%). Já na América Sul – a sub-região mais afetada pelo sobrepeso infantil – houve uma leve diminuição de 7,5% para 7,4% (OPAS; OMS, 2017).

De acordo com as últimas estimativas da OMS para os países da região Europeia, mais de 50% dos homens e mulheres, apresentavam sobrepeso e aproximadamente 23% das mulheres e 20% dos homens eram obesos. O excesso de peso afetou 30-70% e a obesidade afetou 10-30% dos adultos (WHO, 2008). Entre os jovens de 11 anos (ambos os sexos), de acordo com a pesquisa Health Behaviour in School-aged Children (HBSC 2009/2010) em colaboração com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a maior prevalência de excesso de peso foi encontrada na Grécia (33%), Portugal (32%), Irlanda (30%) e Espanha (30%) e a menor foi encontrado na Holanda (13%) e na Suíça (11%) (19). Entre os jovens de 15 anos, a prevalência de excesso de peso variou de 10% (Armênia, Lituânia e Federação Russa) para 23% (Grécia) (CURRIE et al, 2012).

2.1.2.2 Prevalência da obesidade no Brasil

No Brasil, segundo dados divulgados do relatório da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) - Panorama da Segurança Alimentar e Nutricional na América Latina e Caribe, atualmente, mais da metade da população brasileira está com sobrepeso e a obesidade já atinge 20% das pessoas adultas. O sobrepeso em adultos passou de 51,1% em 2010, para 54,1% em 2014. O documento aponta a mesma tendência em relação a obesidade, que passou de 17,8% da população adulta em 2010, para 20% em 2014, com uma maior prevalência entre mulheres, de 22% (OMS; OPAS, 2017).

Ainda segundo os dados da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico Vigitel Brasil 2016, do Ministério da Saúde, realizado nas capitais brasileiras, em 10 anos, a prevalência da obesidade passou de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016, atingindo quase um em cada cinco brasileiros maiores de 18 anos (BRASIL, 2017).

2.1.3 Causas da obesidade

A causa fundamental do acúmulo excessivo de gordura e, por consequência da obesidade, é o balanço energético positivo. O balanço energético pode ser definido como a diferença entre a quantidade de energia consumida e a quantidade de energia gasta na realização das funções vitais e de atividades. Em geral, é determinado pela ingestão de macronutrientes, pelo gasto energético e pela termogênese dos alimentos, portanto, o consumo excessivo de alimentos (calorias), ou mesmo um baixo gasto de energia, podem ser agentes causadores da obesidade. (BOUCHARD, 2000; WANDERLEY; FERREIRA, 2010).

Os fatores que determinam esse desequilíbrio são complexos e podem ter origem genética, metabólica, ambiental e comportamental (BRANDÃO; SILVA, 2012).

Os fatores genéticos desempenham papel importante na determinação da suscetibilidade do indivíduo para o ganho de peso, porém são os fatores ambientais e de estilo de vida, tais como hábitos alimentares inadequados e sedentarismo, que geralmente levam a um balanço energético positivo, favorecendo o surgimento da obesidade (BRAY; POPKIN, 1998; US, 2001; WHO, 2004). Os fatores genéticos provocam cerca de 20 a 25% dos casos de obesidade, e são em doenças específicas como: a síndrome de Prader-Willi, de Laurence-Moon-Biedl, ou mutações no gene produtor e/ou receptor de leptina (HARISON et al, 2008).

A leptina atua no sistema nervoso central, em particular no hipotálamo, desempenhando importante papel no controle da ingesta alimentar e estimulando o gasto energético (PRADO et

al, 2008). A leptina integra o complexo fisiológico que regula o armazenamento, o equilíbrio e o uso de energia pelo organismo, modulando o estado nutricional do organismo para outros sistemas fisiológicos causando inibição sobre o conjunto de alterações neuroendócrinas secundárias a privação alimentar. Ela modifica a expressão e a atividade de inúmeros peptídeos hipotalâmicos que regulam o apetite e o gasto de energia (LICINO; NEGRÃO, 2000).

Outros fatores envolvidos na gênese da obesidade são a colecistocinina (CCK), a ghrelina, o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo YY, que são substâncias envolvidas no controle da ingestão alimentar (DUARTE et al, 2005; GUILÁ, 2006).

A CCK e o peptídeo YY são liberados pelo trato gastrointestinal e ao nível cerebral inibem a ingestão alimentar, promovendo a saciedade após uma refeição. O NPY é sintetizado no SNC e estimula a ingestão. A redução nos níveis de insulina e leptina ativa os neurônios produtores de NPY no hipotálamo, e a leptina inibe sua síntese. A ghrelina é um hormônio gastrointestinal estimulador do apetite e faz parte dos sistemas de regulação do peso corporal. A produção excessiva de ghrelina pode levar à obesidade. Alterações no controle da liberação dessas e de outras substâncias envolvidas na regulação do balanço energético, assim provocando disfunções nos sistemas de regulação do peso corporal por retroalimentação, podem ocasionar a obesidade (DUARTE et al, 2005).

Maus hábitos alimentares e diminuição da realização de exercícios físicos associadas aos fatores genéticos poligênicos são as causas da maioria dos casos de obesidade. À medida em que a sociedade se torna mais desenvolvida e mecanizada, a demanda por atividades físicas diminui, reduzindo o gasto energético diário (FRANCISCH, et al, 2000).

Os hábitos de vida foram modificando ao longo do tempo. A industrialização ofereceu uma maior facilidade na obtenção e no preparo dos alimentos. O padrão de vida passou a ser mais sedentário, as pessoas passaram a comer cada vez mais e a exercitar-se cada vez menos, levando a um superávit calórico, favorecendo a obesidade nas pessoas predispostas geneticamente (MENDONÇA; ANJOS, 2004; REPETTO et al, 2003).

As comodidades oferecidas pelo mundo atual, como a utilização de computadores, videogames, televisão, entre outros, conduzem a um estilo de vida sedentário. Há associação significativa entre o aumento da prevalência de obesidade e a quantidade de horas despendidas com o hábito de assistir televisão. Essa relação pode ser explicada pela natureza sedentária de tal atividade, bem como o consumo de lanches com altos teores de gordura e/ou açúcar durante o período em frente à TV (MUST et al, 1992; FISBERG; OLIVEIRA, 2003; ALMEIDA et al, 2002).

2.1.4 Classificação da obesidade segundo o índice de massa corporal (IMC)

Em 1997, a WHO estabeleceu uma classificação do IMC que, até hoje, permaneceu inalterada. O IMC (calculado através da divisão do peso em kg pela altura em metros elevada ao quadrado, kg/m^2) é o cálculo mais usado para avaliação da adiposidade corporal. O ponto de corte para adultos baseia-se na associação entre IMC e doenças crônicas ou mortalidade. Apesar de não representar a composição corporal, o IMC vem sendo utilizado como uma medida aproximada de gordura total, visto que é altamente correlacionado com a gordura corporal (ANJOS, 1992; NIH, 2012).

Entre as limitações do uso do IMC está o fato de que este indicador pode superestimar a gordura em pessoas muito musculosas e subestimar gordura corporal de pessoas que perderam massa muscular, como no caso de idosos (NIH, 2012; ABESO, 2016).

A classificação adaptada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), apresentada na Tabela 1, baseia-se em padrões internacionais desenvolvidos para pessoas adultas descendentes de europeus (ABESO, 2016; WHO, 2017).

Convenciona-se chamar de sobrepeso o IMC de 25 a 29,9 kg/m^2 e obesidade o IMC maior ou igual a 30 kg/m^2 e de excesso de peso o IMC maior ou igual a 25 kg/m^2 (incluindo a obesidade).

Tabela 1. Classificação internacional da obesidade segundo o índice de massa corporal (IMC) e risco de doença (Organização Mundial da Saúde) que divide a adiposidade em graus ou classes. (Fonte da tabela: ABESO, 2016)

IMC (KG/M ²)	CLASSIFICAÇÃO	OBESIDADE GRAU/CLASSE	RISCO DE DOENÇA
<18,5	Magro ou baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5-24,9	Normal ou eutrófico	0	Normal
25-29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30-34,9	Obesidade	I	Elevado
35-39,9	Obesidade	II	Muito elevado
≥40,0	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

Fonte: World Health Organization.

Os pontos de corte de <16 kg/m^2 (baixo peso grave), 16,0-16,9 (baixo peso moderado), 17,0-18,4 (baixo peso leve) também fazem parte da classificação internacional, mas não estão detalhados na Tabela 1 (WHO, 1995; NIH, 2012; ABESO, 2016).

2.1.5 Consequências da obesidade

2.1.5.1 Consequências da obesidade relacionadas a saúde

Os dados atuais sobre o aumento da prevalência da obesidade no mundo são preocupantes, sobretudo quando se admite que este problema frequentemente não se apresenta de forma isolada, mas como uma condição favorável para o surgimento de outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como diabetes mellitus tipo II, hipertensão arterial, dislipidemias e doenças coronarianas (ENES, 2010; CDC, 2017).

Estimativas globais da OMS revelam que as DCNT são responsáveis por 58,5% das mortes e por 45,9% da carga de doença no mundo (WHO, 2011). No Brasil, as DCNT concentram 72% do total de óbitos, e 75% dos gastos com atenção à saúde no Sistema Único de Saúde (SUS, segundo dados de 2009 do Sistema de Informação de Mortalidade – Percentual que representa mais de 742 mil mortes por ano. As doenças cardiovasculares são responsáveis por 31% do total de óbitos por causas conhecidas no Brasil, e seus fatores de risco (hipertensão arterial, triglicerídeos e Lipoproteína de Alta Densidade (LDL) elevados, Lipoproteína de Baixa Densidade (HDL) baixo, entre outros) estão associados ao sobrepeso e obesidade (RECH et al, 2007; SCHMIDT et al, 2011).

Muitas doenças estão associadas ao sobrepeso e obesidade. Entre elas estão as pulmonares (apneia do sono e asma), ortopédicas (joelhos geno varos, pés planos, torções de tornozelo e aumento do risco de fraturas), neurológicas (hipertensão intracraniana), gástricas (esteatose hepática e refluxo gastroesofágico), endócrinas (resistência à insulina, diabetes Mellitus tipo 2, anormalidades no ciclo menstrual e síndrome do ovário policístico) e cardiovasculares (hipertensão arterial, dislipidemia e hipertrofia do ventrículo esquerdo), sugerindo que o excesso de peso, além de proporcionar o desenvolvimento de doenças crônicas, também pode ocasionar uma notável redução na expectativa de vida (MUST, 1999; WITHROW, 2011). Além disso, a obesidade infantil está associada a uma maior chance de obesidade, morte prematura e incapacidade na idade adulta. Mas, além de aumentar os riscos futuros, as crianças obesas experimentam dificuldades respiratórias, aumento do risco de fraturas, hipertensão, marcadores precoces de doenças cardiovasculares, resistência à insulina e efeitos psicológicos (WHO, 2017).

2.1.5.2 Consequências econômica da obesidade

As consequências econômicas da obesidade e doenças associadas não se limitam aos elevados custos médicos, mas incluem também os custos indiretos ou sociais, tais como:

diminuição da qualidade de vida, problemas de ajustes sociais, perda de produtividade, incapacidade com aposentadorias precoces e morte (BAHIA, 2014).

Relatos internacionais afirmam que uma diminuição de 1% na prevalência de sobrepeso e obesidade em adolescentes entre 16 e 17 anos totalizaria uma economia de US\$586,3 milhões nos gastos futuros com a saúde de adultos (WANG et al, 2010).

Os gastos com as doenças relacionadas com a obesidade representam uma parte significativa do orçamento de vários países. Nos Estados Unidos, o gasto per capita com um indivíduo obeso é cerca de 42 a 100% maior do que um indivíduo com peso normal. Estima-se que os custos médicos anuais nos EUA chegam a US\$ 147 bilhões para adultos e US\$ 14,3 milhões para crianças e adolescentes obesos (FINKELSTEIN, 2009; SCHMIDT et al, 2011; CDC, 2017). O gasto com tratamento de saúde devido à obesidade em países europeus pode representar até 0,6% do produto interno bruto (MÜLLER et al, 2008). Na Alemanha, os custos totais da obesidade (custos diretos e indiretos) compreendem 0,47 a 0,61% do produto interno bruto (PIB) (KONNOPKA et al, 2011).

No Canadá, os custos diretos para o sistema de saúde com as doenças relacionadas ao sobrepeso e à obesidade no ano de 2006 foram de \$ 2 bilhões e \$ 3,9 bilhões, representando 1,4% e 2,6% dos gastos totais em saúde respectivamente (ANIS et al, 2010) e de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, o gasto atribuído à obesidade na América Latina e Caribe circula em torno de US\$65,2 bilhões (RUNGE, 2008).

Estudo recente realizado pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e publicado no jornal científico BMC Public Health, analisou os custos diretos relacionados ao tratamento ambulatorial e hospitalar de doenças associadas ao sobrepeso e à obesidade nos anos 2008 a 2010. Com base nos riscos relativos (GUH et al, 2009) e prevalência de sobrepeso e obesidade no Brasil, estimou-se que o SUS gasta anualmente cerca de R\$ 3,6 bilhões por ano com o tratamento dessas doenças, sendo R\$ 2,4 bilhões com o tratamento hospitalar (68%) e R\$ 1,2 bilhões (32%) com o tratamento ambulatorial (BAHIA, et al, 2012).

2.2 SISTEMA DOPAMINÉRGICO

2.2.1 Dopamina

A dopamina é uma amina biogênica que faz parte do grupo das catecolaminas, que por sua vez se caracterizam, do ponto de vista químico, por apresentar na sua estrutura um grupo catecol (anel benzênico com dois grupos hidroxila proximais), ao qual se acopla uma amina em cadeia lateral. Além da dopamina, outras duas catecolaminas também atuam como

neurotransmissores: a noradrenalina e a adrenalina (JACKSON e WESTLIND-DANIELSSON, 1994). As catecolaminas atuam como mensageiros químicos no SNC (VALLONE et al, 2000).

A dopamina é a principal catecolamina no SNC e desde a descoberta de suas funções fisiológica em 1957, vem atraindo atenção por estar envolvida em várias funções vitais do sistema nervoso, incluindo atividade motora, humor, emoção, afetividade, regulação neuroendócrina, alimentação, recompensa, sono, atenção, memória e aprendizagem. Na periferia, a dopamina desempenha importante papel fisiológico na regulação do olfato, processos da retina, regulação hormonal, funções cardiovasculares, regulação simpática, sistema imunológico, funções renal, entre outros (CARLSSON, 1958; JACKSON e WESTLIND-DANIELSSON, 1994; IVERSEN; IVERSEN, 2007; VIKRAM, 2010).

Estudos sobre a transmissão dopaminérgica surgiram na década de 50, quando a dopamina foi reconhecida como um neurotransmissor independente. A partir da técnica de microscopia de fluorescência, Carlsson e Waldeck em 1958 observaram populações de neurônios contendo dopamina. Posteriormente, outros pesquisadores descreveram mais detalhes sobre o sistema dopaminérgico no sistema nervoso de ratos (CARLSSON, 1958; DAHLSTROM e FUXE, 1964; VIKRAM, 2010).

As projeções dopaminérgicas do SNC estão presentes no corpo estriado, córtex frontal, substância negra, sistema límbico, corpo amigdalóide e hipotálamo (HOKFELT et al, 1976; FALLON e MOORE, 1978).

2.2.2 Síntese da dopamina

A dopamina é sintetizada no citosol dos terminais neuronais dopaminérgicos, em uma sequência de duas reações a partir do aminoácido tirosina, cuja biossíntese (Figuras 5 e 6) inicia-se com o aminoácido tirosina, o qual é proveniente da alimentação e da hidroxilação hepática da fenilalanina pela fenilalanina hidroxilase. A primeira reação é limitante na síntese do neurotransmissor. Consiste em na hidroxilação do anel aromático do aminoácido, catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH), formando o precursor L-DOPA e requer a coenzima tetra-hidrobiopterina. A segunda reação é catalisada pela enzima aminoácido aromático decarboxilase e remove o grupo carboxil da L-DOPA, produzindo dopamina que finaliza a síntese (BEN-JONATHAN, 2001; SIEGEL et al, 2005).

Trabalhos demonstraram que a hidroxilação do aminoácido L-tirosina é o ponto de regulação da síntese de catecolaminas no SNC e, conseqüentemente, a enzima tirosina é a enzima limitante da síntese de dopamina, noradrenalina e adrenalina e está presente predominantemente no citosol das terminações catecolaminérgicas.

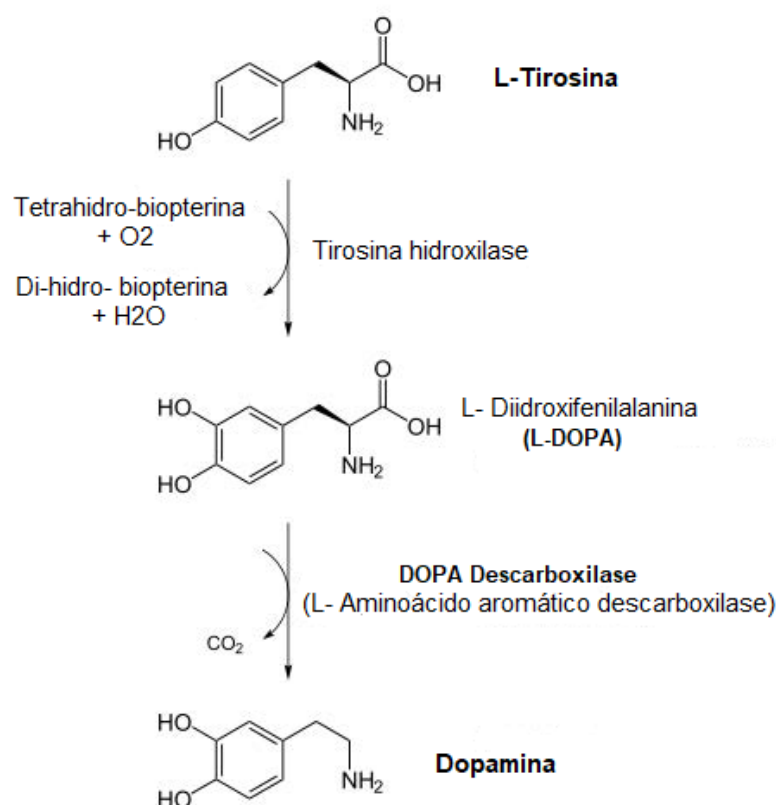


Figura 5. Síntese da dopamina. A primeira etapa na síntese de DA consiste na conversão da tirosina em L-DOPA (1-3,4- diidroxi-fenilalanina ou levodopa) por oxidação da posição 3 no anel de benzeno. A próxima e última etapa na síntese de DA consiste na conversão da L-DOPA em DA pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC). A AADC cliva o grupo carboxila do carbono da cadeia lateral de etilamina, liberando dióxido de carbono. Nos neurônios dopaminérgicos, o produto final da via de síntese das catecolaminas é a dopamina. (Fonte: <https://parkinsonutilidades.blogspot.com.br/2016/12/a-terapia-genetica-na-doenca-de.html>)

A enzima é uma oxidase que utiliza L-tirosina e oxigênio como substratos e tetra-hidrobioterina (BH₄) como co-fator para adicionar um grupo hidroxila ao aminoácido e assim formar a L-DOPA. Na presença da descarboxilase de aminoácidos aromáticos a L-DOPA é convertida em dopamina. (NAGATSU *et al*, 1964; LEVIIT *et al*,1965).

2.2.3 Armazenamento da dopamina

Uma vez sintetizada, a dopamina é armazenada em vesículas sinápticas e sua entrada acontece por um processo ativo, dependente de ATP e do gradiente de pH estabelecido por uma proteína presente nessas vesículas onde permanece neste local para estoque, secreção e proteção contra a inativação enzimática até ser liberada por um mecanismo exocitótico dependente de cálcio quando um potencial de ação alcança o terminal sináptico. A dopamina pode então difundir-se e interagir com receptores tanto pré quanto pós-sinápticos.

Esta interação estimula uma cascata de efeitos via um sistema de segundos mensageiros, o que resulta em diversas mudanças incluindo a ativação de canais iônicos e indução de fatores de transcrição (STONE, 1996; BEN-JONATHAN, 2001). Figura 6.

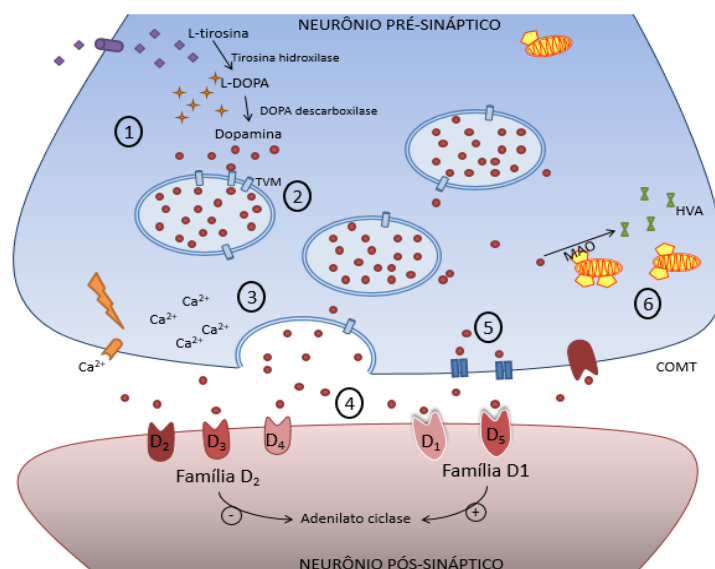


Figura 6. Terminal de um neurônio dopaminérgico, mostrando a síntese da dopamina (DA) a partir da L-tirosina (1), sua entrada nas vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de monoaminas (TVM) e armazenamento (2), liberação na fenda sináptica (3), ação em receptores dopaminérgicos (4), captura da DA extracelular pelo transportador de dopamina (DAT) (5), e metabolismo da DA pela monoaminoxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase (COMT) gerando seus principais metabólitos: ácido homovanílico (HVA), ácido diidroxifenilacético (DOPAC) e pequenas quantidades de 3-metoxitiramina (6). Pereira & Bel (2010).

2.2.4 Liberação e recaptação da dopamina

Uma vez liberada na fenda sináptica, as ações podem ser finalizadas por recaptação ou transporte da dopamina para dentro do terminal pré-sináptico do qual havia sido liberada e por degradação enzimática ou difusão para fora da fenda sináptica (SANTIAGO et al, 1996).

A recaptação de dopamina é realizada diretamente através do transporte desta substância para dentro do terminal juntamente com Na^+ e Cl^- , através da membrana pré-sináptica via um transportador de membrana. Este transportador de dopamina (DAT) é uma glicoproteína de 58-77 KDa com 12 domínios transmembrana, um grande “loop” extracelular e com as porções N e C terminais no lado citosólico (McELVAIN e SCHENK, 1992).

Recentemente tem sido descrito que o DAT também parece estar envolvido na liberação de dopamina citoplasmática combinada com uma redistribuição deste transmissor entre o estoque vesicular e citoplasmático. Esta liberação da dopamina através do DAT ocorre de forma independente de potencial de ação (PIERCE e KALIVAS, 1997).

2.2.5 Catabolismo e inativação da dopamina

As enzimas responsáveis pelo catabolismo da dopamina são a monoamina oxidase (MAO) e a catecol-O-metiltransferase (COMT), que se distinguem inicialmente por sua localização. Assim, enquanto a MAO é uma enzima localizada na membrana externa das mitocôndrias e, portanto, intraneuronal, a COMT é uma enzima extraneuronal que atua fundamentalmente na fenda sináptica. Esta localização distinta de ambas enzimas gera ainda outra importante diferença dado que a COMT age diretamente sobre a dopamina que é liberada no espaço sináptico e a MAO age sobre a dopamina que é recaptada antes que esta volte a ser reutilizada. A COMT transforma a dopamina liberada em 3- metoxitiramina (3-MT) que, por ação da MAO é convertida no produto final da dopamina, o ácido homovanílico (BEN-JONATHAN, 2001; ESTEVINHO, 2003).

2.2.6 Vias Dopaminérgicas

Quatro principais vias dopaminérgicas foram identificadas no cérebro dos mamíferos: (Figura 7) Via mesolímbica que vai da área tegmentar ventral até o sistema límbico e está relacionada ao comportamento emocional, a via mesocortical que abrange os lobos frontais e parece estar envolvida no mecanismo de atenção e orientação, a via nigro-estriada que vai da substância negra até o corpo estriado, atuando nas zonas motoras involuntárias e a via curta, chamada de via tuberoinfundibular que está relacionada a liberação de hormônios da hipófise (ARAKI *et al.*, 2006).

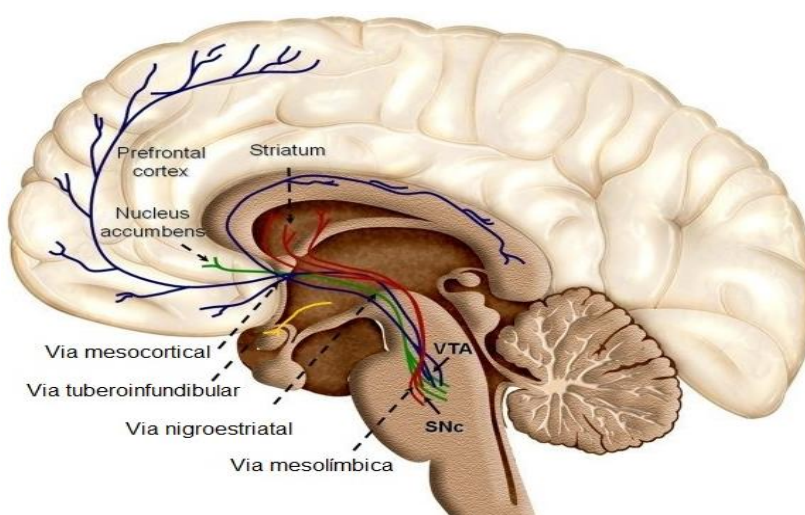


Figura 7. Principais vias dopaminérgicas do encéfalo de humanos. As vias mesolímbica e mesocortical são formadas por projeções dopaminérgicas que partem da área tegmentar ventral e terminam em regiões límbicas sub-corticais ou corticais; a via tuberoinfundibular projeta neurônios do núcleo hipotalâmico para a glândula pituitária posterior; a via nigroestriatal projeta neurônios da substância negra para o estriado. Arias-Carrión *et al.*, 2010.

2.2.7 Receptores Dopaminérgicos

Técnicas modernas de biologia molecular permitiram conhecer, até o presente momento, cinco tipos de receptores dopaminérgicos: D1, D2, D3, D4 e D5. Esses receptores estão organizados em dois grupos: o grupo D1 ou D1-like e o grupo D2 ou D2-like. O grupo D1 está representado pelos receptores D1 e D5; o grupo D2, pelos receptores D2, D3 e D4. A definição desses dois grupos está baseada na ligação com os mecanismos de transdução. Os pertencentes ao grupo D1 estimulam a enzima adenilato ciclase e aumentam o nível intracelular de AMP cíclico enquanto os do grupo D2 inibem essa enzima e diminuem o AMP cíclico intracelular (SIBLEY, 1992; JENNER, 1995; WOLTERS, 1996; WATTS, 1997) (Figura 7).

Os genes dos receptores D1 e D5 não contêm introns, enquanto os genes que codificam os receptores D2, D3 e D4 apresentam seis, cinco e três íntrons, respectivamente. A presença de íntrons permite a geração de variantes do receptor por *splicing* alternativo. Todos os DR2-like apresentam variantes, no entanto, até o momento, somente para o receptor D2, foram identificadas isoformas com significado biológico reconhecido. O receptor D2 apresenta duas variantes, denominadas curta (D2 *short* - D2S) e longa (D2 *long* - D2L), que são geradas por *splicing* alternativo, com a inserção de 29 aminoácidos na terceira alça intracitoplasmática (BEN-JONATHAN, 2001).

2.2.8 Receptor dopaminérgico D1

Os receptores do tipo D1 são os mais abundantes no SNC e são amplamente expressos nos núcleos da base (putamen, caudado, accumbens), tubérculo olfatório, seguidos pelo córtex cerebral, hipotálamo e tálamo. Estes sítios estão envolvidos no controle da execução de movimentos, no controle da fala e na regulação da memória (TARAZI, 2001).

Esse receptor pertence a superfamília dos receptores acoplados a proteína G. Eles possuem uma estrutura de sete domínios transmembrana e são capazes de ativar as proteínas G, do tipo excitatória (G_s) para induzir mecanismos de sinalização intracelular (NEVE et al, 2004). Em geral, as proteínas G são compostas por três subunidades: α , β e γ (PIERCE et al, 2002) e quando estimulada a subunidade α se dissocia do complexo $\beta\gamma$ tornando o sistema ativado. O guanosina difosfato (GDP) é fosforilado a guanosina trifosfato (GTP) ativando alguns sistemas efetores, como do caso da adenilato ciclase (AC) (PIERCE et al, 2002). Dessa forma, a AC estimula a produção do segundo mensageiro, monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico), e a fosforilação das proteinocinases A (PKA) (KEBABIAN; CALNE, 1979; MISSALE et al, 1998).

Diversos substratos da PKA, como a proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB), os receptores ionotrópicos de glutamato (AMPA e NMDA) e determinados canais de íons parecem ser afetados pela estimulação do receptor dopaminérgico D1 (GREENGARD, 2001). Entre os substratos da PKA, a fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc32-KDa (DARPP-32) é uma das moléculas mais estudadas e envolvidas na sinalização do receptor D1. A DARPP-32 é uma fosfoproteína multifuncional presente nos neurônios dopaminérgicos e interneurônios e tem ação moduladora dos sinais celulares em resposta a ação dos neurotransmissores, como a dopamina (SVENNINGSSON et al., 2004).

2.2.9 Receptor dopaminérgico D2

Os receptores do tipo D2 foram os primeiros a serem clonados, e podem ser encontrados nos núcleos accumbens, putamen e caudado, trato olfatório, substância negra (parte compacta) e área tegmental ventral. Também são encontrados em hipófise, retina, rim e sistema vascular. Dados recentes mostram que a exposição crônica a dietas ricas em gordura altera a expressão gênica de receptores de dopamina D2 no estriado e D4 no núcleo ventromedial do hipotálamo, assim como aumenta a expressão de tirosina hidroxilase (essencial para a produção de dopamina) na área tegmental ventral (BUNZOW et al, 1998; VALONE e PICETTI, 2000; HUANG et al, 2005; LI et al, 2009).

O receptor D2 existe sob duas isoformas e estão envolvidos com muitos dos efeitos que a dopamina exerce no SNC e periférico. (GUIVARC'H, MISSALE; BUNZOW et al, 1998; VALLONE e PICETTI, 2000; TARAZI, 2001).

2.2.10 Receptor dopaminérgico D3

Os receptores D3 estão distribuídos na região subcortical límbica e, em menores proporções, nos núcleos da base. O RNAm deste receptor foi detectado no cerebelo e parece estar envolvido na regulação dos movimentos oculares. O receptor D3 também tem sido descrito como um inibidor da adenilciclase, mas o faz menos eficazmente do que o receptor D2 (MISSALE, 1998; TARAZI, 2001).

2.2.11 Receptor dopaminérgico D4

O gene do receptor D4 codifica uma proteína de 387 aminoácidos. Está localizado no braço curto do cromossomo 11, na região 15.5. O receptor D4 é expresso no córtex frontal, amígdala, bulbo olfatório, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo (JACKSON e WESTLIND-DANIELSSON, 1994; TARAZI, 2001)

2.2.12 Receptor dopaminérgico D5

A expressão do RNAm do receptor D5 foi observada no hipocampo e núcleos talâmicos que sabidamente estão envolvidos com a percepção dolorosa. Estes dados sugerem que os receptores D5 possam estar envolvidos no processo talâmico do estímulo doloroso (GRANDY, 1991; JACKSON e WESTLIND-DANIELSSON, 1994).

2.3 COMPORTAMENTO ALIMENTAR

O comportamento alimentar é parte de um sistema de feedback que controla o balanço energético, envolvendo uma complexa interação dos sinais de fome e saciedade, produzidos em estruturas encefálicas como o hipotálamo, bem como em órgãos periféricos, como o trato gastrointestinal (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005; MAGNI et al., 2009). Além disso, também faz parte dessa regulação, os estímulos sensoriais e as propriedades dos alimentos, como gosto e textura (MAGNI et al, 2009).

Para uma melhor compreensão, pode-se dizer que o comportamento alimentar é regulado por duas vias que se complementam: via homeostática (hipotálamo e trato gastrointestinal) e via hedônica (sistema de recompensa) (BERTHOUD, 2006; LUTTER; ERIC, 2009). A via homeostática aumenta a motivação para a ingestão alimentar após depleção dos estoques de energia com o objetivo de regular o balanço energético (LUTTER; ERIC, 2009). Em contrapartida, a via hedônica está relacionada ao sistema de recompensa alimentar, podendo prevalecer sobre a via homeostática durante períodos de abundância energética através do aumento do desejo de consumir alimentos, principalmente os palatáveis (LUTTER; ERIC, 2009).

Em relação aos fatores homeostáticos, a maioria dos trabalhos tem incidido sobre as funções dos hormônios circulantes, os quais transmitem informações sobre os níveis de energia periférica para o cérebro. Entre os hormônios periféricos, a leptina, a insulina e a ghrelina parecem ser os mais importantes. (LUTTER; ERIC, 2009).

A leptina, sintetizada pelo tecido adiposo, e insulina sintetizada pelo pâncreas parecem atuar como um feedback negativo que relaciona o comportamento alimentar com as reservas energéticas do corpo, provocando uma redução significativa na ingestão alimentar e no peso corporal dos indivíduos (WOODS et al., 1979). Em contraste, a ghrelina, um peptídeo liberado pelo estômago, aumenta em resposta a um balanço energético negativo e estimula a ingestão de alimentos e armazenamento de energia (CASTANEDA et al., 2010).

Em relação ao sistema nervoso central (SNC), o hipotálamo é capaz de integrar os sinais periféricos e centrais do controle homeostático deste comportamento (MAGALHÃES et al.,

2010). No âmbito dos sinais periférico, o hipotálamo recebe sinais de fome e de saciedade provenientes do trato gastrointestinal, do pâncreas, do fígado e tecido adiposo (MORTON; CUMMINGS et al., 2006). Já com relação aos sinais centrais, os neurônios serotoninérgicos e dopaminérgicos enviam projeções ascendentes para o hipotálamo de forma controlar o comportamento alimentar, o balanço energético e, conseqüentemente, o peso corporal (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2000; KISHI; ELMQUIST, 2005). O hipotálamo é uma das regiões que controla funções vitais como reprodução, temperatura corporal, balanço hormonal e ritmos circadianos (VERGE; CALAS, 2000; MEISTER, 2007).

Além dos fatores homeostáticos, entender como o cérebro gera sensação de prazer, motivação e aprendizado são de intenso interesse pelos cientistas, pois o ambiente também exerce uma influência significativa sobre os circuitos neurais que atuam na manutenção da homeostase energética. (KELLEY, 2004; ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

O sistema de recompensa alimentar age integrando os estímulos sensoriais desencadeados por determinados tipos de alimentos, como os ricos em açúcar e gordura, gerando sensação de prazer e assim, prolongando uma refeição (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005; BERRIDGE; KRINGELBACH, 2008). É formado pelo núcleo accumbens, pálido ventral, área tegmentar ventral, córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala (BERTHOUD, 2006; LENARD; BERTHOUD, 2008).

O núcleo accumbens é uma região do cérebro que parece desempenhar um papel crucial no comportamento alimentar. Ele recebe informações do tronco encefálico, em relação às sensações gastrointestinais e gosto dos alimentos, através do núcleo do trato solitário (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005) e da mesma forma, os estímulos sensoriais chegam ao córtex pré-frontal e tálamo. O núcleo *accumbens* e área tegmentar ventral enviam informações para a região da amígdala e nela, são processadas e transformadas em estímulos emocionais (prazer), enquanto que o hipocampo funciona como um centro de armazenamento e aprendizado da informação (KELLEY; BERRIDGE, 2002; WARDLE, 2007). Vários neurotransmissores atuam nessas regiões do cérebro, incluindo a dopamina.

2.4 TRATAMENTO DA OBESIDADE

O tratamento da obesidade pode ser realizado por meio de medidas não farmacológicas, farmacológicas e cirúrgicas, e deve objetivar a melhoria do bem-estar e da saúde metabólica do indivíduo. Os meios terapêuticos disponíveis para tal enfermidade englobam as mudanças no estilo de vida, com reeducação alimentar e atividade física regular, redução de peso, somado ao apoio medicamentoso dos fármacos antiobesidade, e a cirurgia bariátrica (FORTES et al, 2006;

HAFEEZ e AHMED; SARKHOSH et al; PADWAL et al, 2013). Estudos científicos têm demonstrado que o sucesso no tratamento da obesidade está associado a perdas ponderais na ordem de 5% a 10%. Tal emagrecimento pode melhorar significativamente os níveis de pressão arterial, o número de apneias e hipoapneias durante o sono e o controle do diabetes e da dislipidemia (WANNMACHER; SALZANO; CORDÁS, 2004; FORTES et al, 2006).

2.4.1 Tratamento não farmacológico da obesidade

Atualmente, o tratamento nutricional recomendado vai além das dietas tradicionais, que frequentemente fracassavam em manter a perda de peso; está baseado principalmente em um planejamento de reeducação alimentar, ao mesmo tempo em que enfatiza cada vez mais a importância da atividade física. Além disso, tendo em vista fatores cognitivos e emocionais associados ao aumento do consumo de alimentos, as técnicas de terapia cognitivo comportamental foram consideravelmente aperfeiçoadas, contribuindo hoje de forma mais efetiva para a mudança dos hábitos de vida do paciente obeso (COUTINHO e CABRAL, 2000).

Apesar da mudança dos hábitos alimentares e estilo de vida sedentária apresentar resultados satisfatórios, 2% dos pacientes não conseguem os resultados desejados somente com estas mudanças, este fato se justifica, pois, há evidências de influência endógena (GAGLIARDI, 2001).

2.4.2 Tratamento farmacológico da obesidade

O uso de medicamentos no tratamento da obesidade e sobrepeso está indicado quando houver falha do tratamento não farmacológico, em pacientes com: IMC igual ou superior a 30 kg/m²; com IMC igual ou superior a 25 kg/m² associado a outros fatores de risco, como a hipertensão arterial, DM tipo 2, hiperlipidemia, apneia do sono, osteoartrose, gota, entre outras; ou com circunferência abdominal maior ou igual a 102cm (homens) e 88cm (mulheres) (WHO, 1998; FORTES et al, 2006; KHAN et al, 2012; ABESO, 2016).

Dentre os fármacos mais utilizados no tratamento da obesidade estão os anorexígenos, os inibidores da lipase pancreática e os inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina entre outros (WANNMACHER, 2004).

Um medicamento útil para tratamento da obesidade deve possuir as seguintes características: demonstrar efeito em reduzir o peso corporal e levar a melhora das doenças dependentes do excesso de peso; ter efeitos colaterais toleráveis e/ou transitórios; não ter propriedades de adição; apresentar eficácia e segurança mantidas a longo prazo; possuir mecanismo de ação conhecido; idealmente ter um custo razoável (GUY-GRAND, 1989).

A farmacoterapia da obesidade não é recomendada em crianças, uma vez que até ao presente não há dados suficientes sobre os seus efeitos secundários em idade (MANCINI, 2002). Existem, atualmente, três medicamentos aprovados para tratamento da obesidade no Brasil: Sibutramina, Orlistate e Liraglutida 3,0 mg (ABESO, 2016).

2.4.3 Associação Naltrexona/Bupropiona no tratamento da obesidade

A bupropiona é um inibidor da recaptação da dopamina (DA) e noradrenalina NA atualmente aprovado para o tratamento da depressão e como coadjuvante da cessação tabágica. A naltrexona é um antagonista de recetor opióide μ , aprovado para o tratamento da dependência aos opiáceos e ao álcool (FARIA et al, 2010; POWELL et al, 2011).

Apesar da eficácia discreta destes fármacos quando usados isoladamente, a melhor compreensão das complexas vias de regulação central e periférica do apetite permitiram que se postulasse um efeito sinérgico da sua associação (SIMPSON et al, 2009).

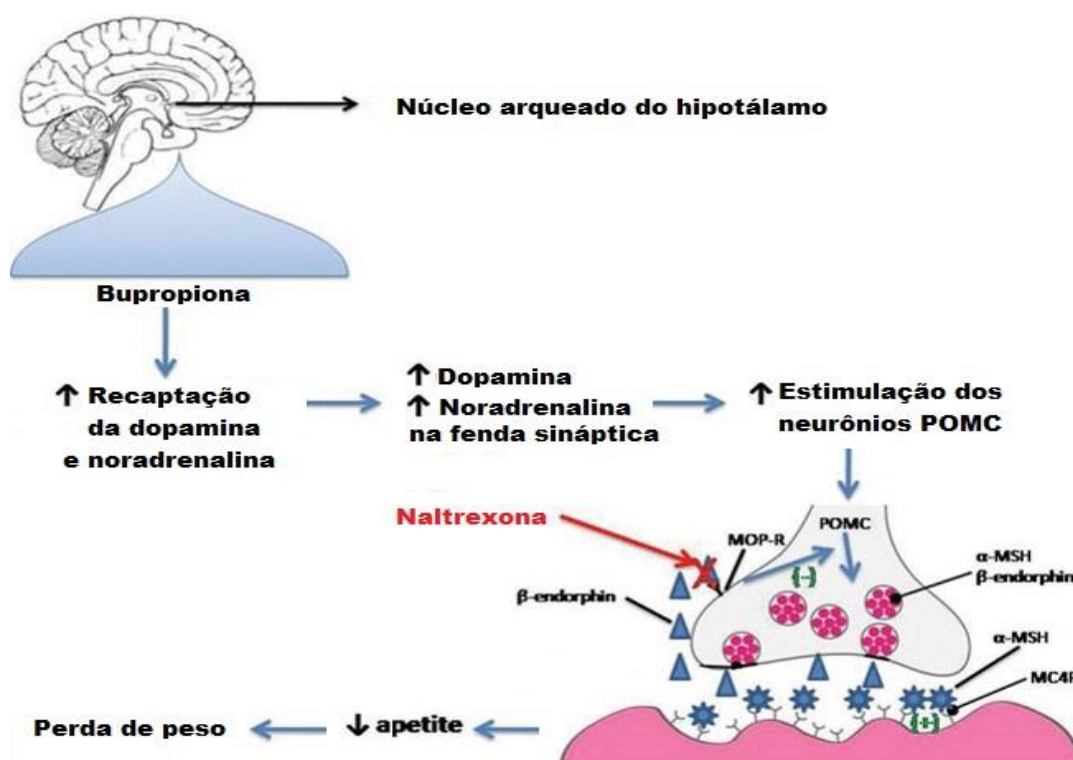


Figura 8 – Hipótese do mecanismo de ação da associação de naltrexona com bupropiona (CHRISTOU; KIORTSIS, 2015).

O aumento dos níveis de DA e NA mediado pela bupropiona estimula a atividade neuronal da POMC, que resulta num aumento da α -MSH, com efeito anorexígeno. Essa maior

concentração no núcleo arqueado aumenta a sinalização de neurônios produtores de POMC (pró-opiomelanocortina).

O POMC liberado após essa sinalização é rapidamente clivado em alfa-MSH e beta-endorfinas. O alfa-MSH é uma substância reconhecidamente anorexigênica, agindo nos receptores 3 e 4 de melanocortina (MC3R e MC4R) e que também aumenta o gasto energético.

O efeito da bupropiona no peso, porém, não é tão pronunciado, pois a beta-endorfina que é produzida em conjunto, um opioide endógeno, inibe diretamente a via da POMC, numa retroalimentação de alça curta (GREENWAY et al, PADWAL, 2009). Um excesso de beta-endorfinas leva a um aumento do consumo alimentar em roedores, principalmente de alimentos mais palatáveis (LEE e FUJIOKA, 2009).

A associação da naltrexona (antagonista opiáceo) foi considerada para combater este feedback negativo de modo a alcançar uma maior perda de peso (POWELL et al, 2011). Ao inibir os recetores opióides, a naltrexona liberta os neurónios da POMC da inibição pela β -endorfina, potenciando a estimulação dessa via pela bupropiona (GREENWAY et al, PADWAL, 2009) (Figura 8). Para além disso, a naltrexona parece reduzir as propriedades de prazer da ingestão de alimentos, através da interação com o sistema mesolímbico de recompensa (KENNETT e CLIFTON, 2013). Figura 8.

3 HIPÓTESES

- ✓ O uso combinado de naltrexona/bupropiona (NAL/BUP) promove em animais obesos, redução no peso corporal, redução no consumo alimentar, antecipação do comportamento de saciedade e redução na preferência por alimentos densamente energéticos.
- ✓ O uso combinado de naltrexona/bupropiona (NAL/BUP) promove redução da atividade da via dopaminérgica relacionada ao comportamento alimentar, bem como aumenta os níveis da expressão gênica da tirosina hidroxilase e dos receptores dopaminérgico D₁ e D₂ no núcleo *accumbens* e estriado de ratos obesos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito do uso combinado de naltrexona/bupropiona (NAL/BUP) sobre a via de sinalização dopaminérgica relacionada ao controle do comportamento alimentar em ratos *wistar* obesos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da combinação NAL/BUP em animais normonutridos e obesos sobre:

- ✓ Peso corporal;
- ✓ Consumo alimentar;
- ✓ Índice de Lee;
- ✓ IMC;
- ✓ Preferência a macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídeos);
- ✓ Sequência Comportamental de Saciedade;
- ✓ Glicemia capilar;
- ✓ Massa relativa do fígado, rins, gordura abdominal e perigonadal;
- ✓ Perfil bioquímico;
- ✓ Perfil hematológico;
- ✓ Níveis de expressão gênica da enzima TH e receptores DRD_{1a} e DRD₂ no Nac e estriado;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos da linhagem *wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Para obtenção dos animais experimentais, fêmeas reprodutoras adultas foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho, sendo a prenhez diagnosticada pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. Confirmada a prenhez, as fêmeas foram alocadas em gaiolas individuais, e observadas rotineiramente para registro do dia de nascimento dos filhotes. Vinte e quatro horas após o nascimento, foi realizado o procedimento de sexagem, sendo a ninhada ajustada para 8 filhotes (proporção de 4 machos: 4 fêmeas) escolhidos aleatoriamente, considerando o peso entre 6 a 8g. As fêmeas foram utilizadas apenas para compor as ninhadas. Este dia foi considerado como o primeiro dia de vida dos filhotes. Os filhotes permaneceram com as mães até completarem 21 dias de idade, período no qual ocorreu o desmame. Após o desmame os animais foram submetidos à dieta padrão de laboratório. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em condições padrão de biotério seguindo recomendação ética do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Os procedimentos foram aprovados de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UFPE (nº 23076.053208/2014-57) (Anexo A).

5.2 OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais foram obtidos por 40 filhotes machos, nascidos de 15 fêmeas reprodutoras que formaram os seguintes grupos (Figura 9):

- **Grupo dieta padrão:** constituído de 20 filhotes machos que após o desmame foram alimentados com ração padrão de biotério (Presence®);
- **Grupo dieta de cafeteria:** constituído de 20 filhotes machos que após o desmame foram alimentados com ração palatável (dieta de cafeteria).

Dos grupos dieta padrão e dieta de cafeteria foram formados os seguintes subgrupos:

- **Normonutrido sem tratamento:** constituído de 10 filhotes machos que após o desmame foram alimentados com ração padrão de biotério e submetidos ao tratamento com aplicação de 1ml/kg de água destilada por via subcutânea.

- **Normonutrido com tratamento:** constituído de 10 filhotes machos que após o desmame foram alimentados com ração padrão de biotério e submetidos ao tratamento com aplicação da combinação de NAL 1mg/kg e BUP 20mg/kg (Sigma-Aldrich® Toronto), por via subcutânea.
- **Obeso sem tratamento:** constituído de 10 filhotes machos que após o desmame foram alimentados com dieta de cafeteria e submetidos ao tratamento com aplicação de 1ml/kg de água destilada por via subcutânea.
- **Normonutrido com tratamento:** constituído de 10 filhotes machos que após o desmame foram alimentados com dieta de cafeteria e submetidos ao tratamento com aplicação da combinação de NAL 1mg/kg e BUP 20mg/kg (Sigma-Aldrich® Toronto), por via subcutânea.

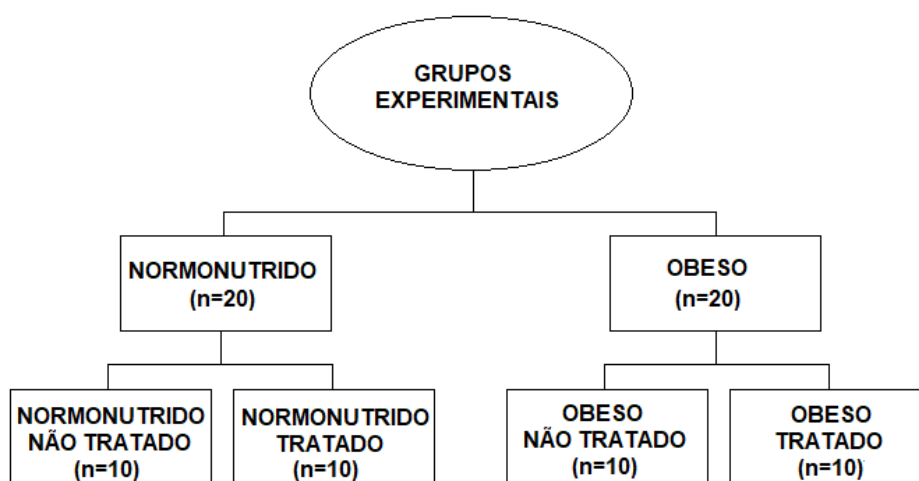


Figura 9 – Organograma demonstrando a formação dos grupos experimentais. Grupo normonutrido: (dieta padrão Presence®); Grupo obeso: (dieta de cafeteria). Os animais dos grupos normonutrido não tratado e obeso não tratado receberam aplicação de 1ml/kg de água destilada e os animais dos grupos normonutrido tratado e obeso tratado, receberam aplicação da associação naltrexona (1mg/kg) e bupropiona (20mg/kg) respectivamente por via subcutânea.

5.3 DIETAS EXPERIMENTAIS

A ração padrão foi fornecida *ad libitum*, todos os dias ao grupo normonutrido, e consistiu de ração comercial Presence® desenvolvida para ratos e camundongos de laboratório (Agribbrands Purina do Brasil, LTDA) com fornecimento calórico de 3,3 kcal/g. (Informações fornecidas pelo fabricante), conforme a tabela 2.

Tabela 2. Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta padrão de biotério (normocalórica) oferecida aos animais experimentais.

Componentes	(g/100%)	(%/Kcal)
Proteína	24,30	29,0
Carboidratos	56,00	62,0
Lipídios	3,20	9,0
Fibras	5,00	0,0
VET (kcal/g)	3,30	3,30

As informações da composição centesimal da ração comercial para ratos e camundongos de laboratório foram obtidas no rótulo do produto fornecido pela empresa Evialis Presence® Ração Animal, 2017 e são baseadas em recomendações do National Research Council e National Institute of Health – USA.

A ração palatável (dieta de cafeteria) fornecida aos animais com objetivo de induzir obesidade para formação do grupo experimental obeso foi baseada em Calvalcante et al (2013) e para produção, foram utilizados ingredientes purificados/semipurificados industrializados (Laboratório Rhoster Indústria e Comércio) e alimentos naturais, e foi preparada no Departamento de Nutrição da UFPE, para as fases de crescimento e manutenção dos ratos, com fornecimento calórico de 4,0 kcal/g. Estes ingredientes foram moídos, misturados e oferecidos na forma de pellets aos animais experimentais (Tabela 3).

Tabela 3 - Ingredientes da dieta de cafeteria utilizada nos experimentos

Componentes	Crescimento (g/kg)	Manutenção (g/kg)
Maisena	117,00	157,00
Ração padrão	80,00	80,00
Biscoito Maisena Chocolate	50,00	50,00
Farinha de Soja	40,00	40,00
Caseína	200,00	150,00
Celulose	40,00	40,00
Óleo de Milho	10,00	15,00
Óleo de Soja	20,00	25,00
Banha (Banha Sadia)	53,00	53,00
Manteiga	40,00	40,00
Margarina (85% de lipídeos)	40,00	40,00
Creme de Leite (20% de lipídeos)	40,00	40,00
Açúcar	220,00	220,00
Mix Mineral	25,00	25,00
Mix Vitamínico	7,00	7,00
Colina	2,50	2,50
Metionina	2,50	2,50
BHT = 0,14mg	0,14	0,14
NaCl (39,34%)	3,00	3,00
Grutamato Monossódico (12,3% de Na)	10,00	10,00
TOTAL	1000,14	1000,14

Dieta palatável hiperlipídica (dieta de cafeteria) previamente descrita e padronizada por Estadella *et al* (2004), utilizada por Santos *et al* (2010) e analisada por Oliveira *et al* (2011) e modificada por Cavalcante (2013).

O conteúdo energético da dieta de cafeteria, foi determinado em um calorímetro adiabático IKA-C400 no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos/Universidade Federal de Pernambuco (LEAAL/UFPE) (Tabela 4).

Tabela 4. Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta de cafeteria de Crescimento e Manutenção oferecida aos animais experimentais.

Componentes	Crescimento		Manutenção	
	(g/100%)	(%/Kcal)	(g/100%)	(%/Kcal)
Proteína	18,00	18,00	14,00	14,00
Carboidratos	44,00	44,00	47,00	47,00
Lipídios	17,20	38,0	18,00	39,0
Fibras	5,20	0,0	5,20	0,0
VET (kcal/g)	4,03	4,03	4,06	4,06

Análises realizadas no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos/Universidade Federal de Pernambuco (LEAAL/UFPE) com base nas informações fornecidas pelo fabricante dos ingredientes da dieta de cafeteria para Crescimento (Rhostrer indústria e Comércio 2017)

5.4 EXPERIMENTOS

5.4.1 Análise da evolução ponderal

O peso corporal dos animais foi verificado no 21º dia pós-natal (desmame) e logo após o período de adaptação ao ambiente e a dieta (8 dias), passou a ser verificado duas vezes por semana até completar o período de 11 semanas de ingestão das dietas experimentais pelos grupos normonutrido e obeso. Após o período de 11 semanas de ingestão das dietas, deu-se início ao tratamento farmacológico, e o peso dos animais passou a ser verificado diariamente até completar 14 dias do tratamento, ou seja, até o 121º dia de vida dos animais.

Para as medidas foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000®).

5.4.2 Análise do consumo alimentar antes do tratamento pelo uso combinado de NAL/BUP

A análise do consumo alimentar antes do tratamento farmacológico foi realizada do 29º ao 106º dia de vida (11 semanas). Neste período os animais foram alojados em gaiolas com no máximo 3 animais e formaram dois grupos experimentais: **normonutrido** (n=20) que receberam ração comercial padrão de biotério Presence® e **obeso** (n=20) que receberam dieta de cafeteria. A quantidade de dieta ingerida foi obtida duas vezes por semana, no período de

12/12 horas do ciclo claro/escuro. O alimento foi removido e pesado para obtenção do consumo por diferença entre a quantidade oferecida e a rejeitada. Para a pesagem foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000®).

5.4.3 Análise do consumo alimentar durante o tratamento pelo uso combinado de NAL/BUP

A análise da ingestão alimentar durante o período do tratamento farmacológico foi realizada do 107° ao 121° dia de vida. Neste período os animais dos grupos **normonutrido** (n=20) e **obeso** (n=20) foram alojados em gaiolas individuais e formaram quatro subgrupos (Figura 1): **normonutrido sem tratamento (NST)** (n=10) que receberam ração comercial padrão de biotério Presence® e aplicação diária de injeção subcutânea de água destilada na dose de 1ml/kg; **normonutrido com tratamento (NCT)** (n=10) que receberam ração comercial padrão de biotério Presence® e aplicação diária de injeção subcutânea de naltrexona/bupropiona na dose combinada de 1mg/20mg/kg (Sigma-Aldrich® Toronto); **obeso sem tratamento (OST)** (n=10) que receberam ração dieta de cafeteria e aplicação diária de injeção subcutânea de água destilada na dose de 1ml/kg; **obeso com tratamento (OCT)** (n=10) que receberam dieta de cafeteria e aplicação diária de injeção subcutânea de NAL 1mg/kg e BUP 20mg/kg (Sigma-Aldrich® Toronto). A quantidade de dieta ingerida foi obtida diariamente, no período da fase escura do ciclo invertido de 12/12 horas (claro/escuro). O alimento foi removido e pesado para obtenção do consumo por diferença entre a quantidade oferecida e a rejeitada. Para a pesagem, foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000).

5.4.4 Índice de LEE

O índice de obesidade para roedores (Lee Index) foi calculado através do comprimento naso-anal e o peso corporal, onde: Índice de Lee = (raiz cúbica ($3\sqrt{\text{ }}$) do peso corporal (g) /comprimento naso-anal (cm) x 1000) (adaptado BERNARDIS e PATTERSON, 1968). Essas medidas foram realizadas antes do início e depois do término do tratamento farmacológico, ou seja, primeira ao 100° de vida (após início do consumo das dietas) a segunda feita após 121° dia de vida (após término do tratamento farmacológico) e antes da eutanásia dos animais. Foi utilizado papel milimetrado para registro do comprimento nasoanal e fita métrica antropométrica (inextensível) para medidas perimétricas.

5.4.5 Índice de massa corporal (IMC)

Índice de adiposidade muito usado em ratos e que guarda relação positiva com o índice de Lee (NERY et al, 2011). Foi determinado através da relação entre peso corporal (g) e o quadrado do comprimento nasoanal (cm²) (NOVELLI et al, 2007).

5.4.6 Teste de Preferência a macronutrientes

Entre o 110º e 115º dia de vida, os animais do grupo normonutrido foram submetidos ao teste de preferência a dietas com predominância de macronutrientes (proteica, glicídica e lipídica) (SILVA et al, 2014). Antes de iniciar o teste, os animais foram colocados em gaiolas individuais para adaptação por 4 dias (a dieta e a gaiola) e formaram quatro subgrupos: NST (n=5), NCT (n=5), OST (n=5) e OCT (n=5). Após o período de adaptação, os animais receberam aplicação de injeção de água destilada (1ml/kg) ou da combinação de NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) por via subcutânea (conforme cada grupo experimental), e em seguida foi disponibilizado aos animais normonutridos 30g de dieta padrão (3,3 kcal/g) e 30g de cookie de chocolate (5,0 kcal/g) e aos animais obesos foi disponibilizado 30g da dieta de cafeteria (4,0 kcal/g) e 30g de cookie de chocolate (5,0 kcal/g).

A ingestão (g) de cada dieta foi calculada como a diferença entre a quantidade da dieta fornecida e rejeitada, e foi pesada no início do experimento e em cada intervalo de tempo proposto para comparação, ou seja, a cada 12 horas do ciclo invertido (claro/escuro). Os resultados representam a ingestão média de macronutrientes predominantes na dieta para cada animal durante 24 horas do experimento.

Para a pesagem, foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000®).

5.4.7 Sequência Comportamental de Saciedade (SCS)

A sequência comportamental de saciedade (SCS) é um método não invasivo que consiste em avaliar, durante um intervalo de tempo, comportamentos alimentares e não alimentares com a finalidade de se determinar a saciedade. Este procedimento foi realizado segundo protocolo adaptado de Halford et al, (1998). Aos 110 dias, os animais de cada grupo experimental normonutridos (NST (n=8), NCT (n=8) e obesos OST (n=8), OCT (n=8) foram, inicialmente, submetidos a uma breve privação alimentar por quatro horas para estimular a busca pelo alimento. Em seguida foi ofertada uma quantidade conhecida de dieta padrão de biotério ou dieta ocidentalizada (Palatável) respectivamente (30g), e durante 60 minutos foi registrada a duração (em segundos) dos comportamentos de: **Alimentação:** O registro desse

comportamento foi iniciado após o rato colocar-se junto ao comedouro iniciando a consumo do alimento. O mesmo foi finalizado quando o rato abandonar o comedouro. **Descanso:** Esse comportamento foi registrado quando o animal não estava se alimentando ou se limpando, ficando quieto, deitado na gaiola. **Limpeza:** O comportamento de limpeza é um comportamento estereotipado constituído por sub-comportamentos que ocorrem em uma sequência temporal definida. Iniciou-se com o lambar de patas anteriores e movimentos dessas sobre a cabeça, continuando a lambar a região ventral, dorso e patas posteriores.

O alimento ofertado e rejeitado durante a SCS foi pesado e protocolado e o ponto de saciedade determinado pelo ponto de cruzamento dos comportamentos que determinam o final da alimentação e início do descanso. Durante a SCS foram avaliados ainda parâmetros microestruturais da alimentação como: Tamanho da refeição e taxa de alimentação (quantidade em gramas de alimento consumido por duração de refeição), duração da alimentação (tempo durante todo o período de monitoramento em que o animal está de fato se alimentando), Duração da limpeza (tempo durante todo o período de monitoramento em que o animal está de fato se limpando).

5.5 ESTUDOS

5.5.1 Análise de Parâmetros Metabólicos: Níveis de Glicose capilar

A coleta de amostras sanguíneas foi realizada com os animais dos diferentes grupos experimentais antes do início do tratamento e após o término do tratamento farmacológico. Amostra (aproximadamente 2 μ L) de sangue foi obtida por pequeno corte na extremidade da cauda do animal e será depositado numa fita teste (Roche Diagnostics®). Os níveis de glicose foram determinados usando um glicosímetro automático (Accutrend GCT, Roche Diagnostics®) (LAGE, GUERRA, PELOGIA, 2014).

5.5.2 Análise da massa relativa dos órgãos (Fígado, Rins, Gordura abdominal e Testículos)

Após o processo de sacrifício dos animais, os órgãos (rins, fígado, baço e estômago) foram retirados e pesados. Então foi realizado o cálculo da massa relativa dos órgãos de cada animal dividindo-se o peso de cada órgão (g) pelo peso corporal de cada animal no dia da coleta (121ª dia de vida), e multiplicando-se o resultado por 100. Tendo assim um resultado expresso em g/100 g de peso vivo (g/100g p.v.) (MUNIZ et. al., 2013).

5.5.3 Análise dos parâmetros bioquímicos

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras séricas usando um analisador automatizado para bioquímica clínica CMD 800iX1 (Wiener Lab Group). O soro foi obtido por centrifugação do sangue em microtubos contendo acelerador de coagulação e sem anticoagulantes, a 3500 rpm por 5 minutos. Kits de diagnóstico padronizados (Labtest®) foram utilizados para as avaliações espectrofotométricas dos seguintes parâmetros bioquímicos: Lipase, Fosfatase alcalina (ALP), Creatinina, Ureia, Ácido úrico, Alanina transaminase (ALT), Aspartato transaminase (AST), Albumina, Glicose, Proteínas totais, Triglicerídeos, Colesterol total, Colesterol HDL e Gama GT (BRANCO et al, 2011).

5.5.4 Análise dos parâmetros hematológicos

As análises hematológicas foram realizadas em amostras de sangue total coletado em tubos contendo EDTA, utilizando um analisador automatizado hematológico Sysmex XT-4000i (Roche®). Foram avaliados os seguintes parâmetros: Leucócitos (x103/μL); Hemoglobina (g/dL); Hematócrito (%); volume corpuscular médio - fL (VCM), hemoglobina corpuscular média - pg (CHM), concentração da hemoglobina corpuscular média - g/dL (CHCM), Plaquetas (x103/μL); Neutrófilos (%); Linfócitos (%); Monócitos (%); Eosinófilos (%); Basófilos%. MPV (%), RDW (%), RBC (%) (BRANCO et al, 2011).

5.5.5 Análise da expressão gênica dos receptores D1, D2 no núcleo *accumbens* e estriado

A expressão gênica foi realizada em 10 animais do **grupo normonutrido: NST** (n=5), **NCT** (n=5) e em 10 animais do **grupo obeso: OST** (n=5), **OCT** (n=5), pela técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR). Aos 122 dias de vida, os animais foram pesados e anestesiados com Isoflurano por via inalatória e em seguida foram sacrificados por decapitação (guilhotina) para retirada do encéfalo e dissecação das estruturas para análise. Ao se isolar as estruturas, essas foram armazenadas, em recipientes individuais, e congeladas a -80°C até a análise da expressão gênica. O RNA foi extraído utilizando o reagente QIAzol Lysis Reagent (Qiagen®) e tratado com DNase por 30 minutos a 37 °C. Em seguida 2μL de RNA purificado foi transcrito reversamente usando QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen®) em um volume total de 20μL. O cDNA resultante foi diluído 50 vezes em água livre de DNase e RNase. Em seguida, 4,5μL de cada amostra de cDNA diluído foi utilizado como molde para amplificação por PCR utilizando SYBR Green (Qiagen®) como fluorogênico em termociclador (Qiagen®). Os parâmetros foram: desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. As sequências direta e reversa (*forward e reverse*)

do *primer* utilizado para amplificação do **DRD1a**: *forward*, 5' -CTC TGT CTG TCC TTA TAT CCT TCA TCC -3'; *reverse*, 5' -AGT TGT CAT CCT CGG TGT CCT -3', **DRD2** *forward*, 5' -CAA CAA TAC AGG CAA ACC AGA ATG AG -3' e *reverse*, 5' -ACC AGC AGA GTG ACG ATG AAG G -3', **TH** *forward*, 5' -GGC TTC TCT GAC CAG GTG TAT CG-3', *reverse*, 5' -GCA ATC TCT TCC GCT GTG TAT TCC-3' e **β -actina** *forward*, 5' -ACG GTC AGG TCA TCA CTA TCG -3', *reverse*, 5' -CAG CAC TGT GTT GGC ATA GAG -3' e foram sintetizados e purificados por IDT – Integrated DNA Technologies (EUA). Os níveis de expressão relativa de mRNA dos receptores dopaminérgicos DRD1a e DRD2 e da enzima TH no estriado ventral, foram calculados através do método comparativo $\Delta\Delta C_t$ [threshold cycle] (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), tendo a β -actina, como gene normalizador.

5.6 MÉTODOS DE ANÁLISES

Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-wilk, para demonstrar se os resultados poderiam ser analisados de forma paramétrica ou não paramétrica. Para as diferenças estatísticas foram utilizados os testes: t de *Student* para o consumo alimentar total antes e durante o tratamento, ANOVA de uma via seguido por Tukey pós-teste para as análises de expressão gênica da enzima TH, DRD_{1a} e DRD₂. Para os demais experimentos, utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido por Bonferroni pós-teste, exceto para a sequência comportamental de saciedade, e do teste de preferência a macronutrientes que utilizou ANOVA de duas vias, seguido por Tukey pós-teste. O nível de significância foi considerado p igual ou menor que 0,05. Todos os dados foram analisados usando o programa GraphPad PRISM® versão 7 (San Diego, USA).

5.7 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos experimentais com os animais foram realizados de acordo com as recomendações éticas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL, obedecendo às normas de manuseio e cuidado com os animais estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Todos os procedimentos foram aprovados de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, sob o protocolo 23076.053208/2014-57 (Anexo A).

6 RESULTADOS (*Artigo original submetido ao European Journal of Pharmacology*)

NALTREXONA/BUPROPIONA ALTERA O COMPORTAMENTO ALIMENTAR E AUMENTA A EXPRESSÃO GÊNICA DA TIROSINA HIDROXILASE E DE RECEPTORES DRD₂ NO NÚCLEO ACCUMBENS E NO ESTRIADO EM RATOS OBESOS

NALTREXONA/BUPROPIONA ALTERS FOOD BEHAVIOR AND INCREASES GENE EXPRESSION OF TYROSINE HYDROXYLASE AND DRD2 RECEPTORS IN THE NUCLEUS ACCUMBENS AND STRIATUM IN OBESE RATS

Gilvanildo Roberto da Silva^a, Mariane Gomes Carneiro^b, Miriam Pereira Barbosa^c, Jaciane de Almeida Costa^d, Lisiane dos Santos Oliveira^e, Elizabeth do Nascimento^f, Rhowena Jane Barbosa Matos^{ag}, Nicodemos Teles de Pontes Filho^d, Manuela Figueiroa Lyra de Freitas^{dh1}, Sandra Lopes de Souza^{ah}.

^aPPG – Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Profº Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil

^bDepartamento de Enfermagem, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Profº Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil

^cDepartamento de Biomedicina, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Profº Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil

^dPPG – Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Profº Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil

^eNúcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório, s/n, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

^fDepartamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Profº Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil

^gNúcleo de Educação Física, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório, s/n, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

^hDepartamento de Anatomia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Profº Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil

¹Autor Correspondente. Departamento de Anatomia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, R. Profº Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil -CEP: 50670- 420 Tel.: +55 81 2126-8555 - Telefax. +55 81 2126- 8000 - E-mail: manuelafif@hotmail.com

Resumo

Objetivo: Avaliar o efeito do uso combinado de naltrexona/bupropiona (NAL/BUP) sobre o comportamento alimentar e na expressão gênica de receptores DRD_{1a} e DRD₂ no núcleo *accumbens* e no estriado em ratos obesos. **Método:** Foram utilizados ratos da linhagem *wistar* divididos em dois grupos de acordo com a dieta oferecida: n=20 normonutrido (dieta padrão de biotério) e n=20 obeso (dieta de cafeteria). Foram analisados: peso corporal e consumo alimentar durante o tratamento pela combinação de NAL/BUP; índice de Lee; índice de massa corporal (IMC); preferência a macronutrientes, sequência comportamental de saciedade (SCS), massa relativa de gordura abdominal e perigonadal; expressão gênica da tirosina hidroxilase (TH) e dos receptores DRD_{1a} e DRD₂ no núcleo *accumbens* e no estriado. **Resultados:** O uso combinado de NAL (1mg/kg) BUP (20mg/kg) promoveu em animais obesos, redução nas medidas da ingestão alimentar, do peso corporal, dos índices de Lee e IMC, da massa relativa de gordura abdominal e de gordura perigonadal. Além disso, NAL/BUP reduziu a preferência por macronutrientes como carboidratos e lipídeos, antecipou a saciedade, e aumentou os níveis da expressão gênica da enzima TH e DRD₂, mantendo os níveis de DRD_{1a} inalterados. **Conclusões:** O uso combinado de NAL/BUP promove aumento nos níveis de expressão gênica da enzima tirosina hidroxilase e de receptores DRD₂ no núcleo *accumbens* e no estriado e altera o comportamento alimentar de ratos obesos, promovendo redução no consumo alimentar, principalmente de alimentos densamente energéticos, o que contribui na perda do peso corporal.

Palavras-Chave: Obesidade, Naltrexona, Bupropiona, Receptor de dopamina, qPCR.

Introdução

A obesidade é uma doença complexa e multifatorial que se desenvolve a partir da interação de fatores metabólicos, genéticos, sociais, comportamentais e culturais [1]. Dados da Organização mundial de saúde estima que atualmente existem 2,3 bilhões de pessoas com sobrepeso e 700 milhões de obesos em todo mundo. Projeções para o futuro indicam que, em 2030, estes números chegarão a 3,3 bilhões de pessoas, o que significa que 57,8% da população mundial estará com sobrepeso ou obesidade, o que remete a um agravante na saúde da população [2-4].

A obesidade tem sido relacionada ao maior consumo de alimentos palatáveis, devido as alterações nos mecanismos neurais de controle do comportamento [5, 6]. A preferência por esse tipo de alimento juntamente as respostas hedônicas, que são respostas prazerosas e motivadoras promovidas pelo cérebro [7, 8], geram a produção e liberação de muitas substâncias, dentre elas a dopamina, que participa dos mecanismos neurais de controle do comportamento alimentar através da ação dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ [9, 10].

A dopamina (DA) desempenha um papel crítico na regulação da ingestão de alimentos. Sua ação no hipotálamo está relacionada a promoção da ingestão de alimentos [11], porém nos circuitos de recompensa está associada aos aspectos gratificantes dos alimentos [12-15].

Mesmo na ausência de fome, o prazer e a sensação de recompensa, fazem com que haja maior consumo de alimentos palatáveis. O núcleo *accumbens* e estriado tem sido amplamente relacionado a comportamentos direcionados relacionados a alimentação [16-18]. Acredita-se que a liberação da dopamina no núcleo *accumbens* e estriado está associada com a ingestão de alimentos, principalmente os palatáveis, como chocolate e biscoito [10].

Estudos recentes, sobre processos reguladores de homeostase energética têm colaborado para o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos contra a fisiopatologia da obesidade e a associação de naltrexona e bupropiona (NAL/BUP) tem se destacado por atuar causando perda significativa no peso corporal tanto em animais quanto em humanos [19, 20].

A bupropiona é inibidor da recaptção da dopamina e noradrenalina e a naltrexona é antagonista do receptor μ opióides [21, 22]. Apesar da eficácia discreta destes fármacos quando usados isoladamente, a melhor compreensão das complexas vias de regulação central e periférica do apetite permitiram que se postulasse um efeito sinérgico da sua associação [23].

O aumento dos níveis de dopamina e noradrenalina mediado pela bupropiona estimula a atividade neuronal do POMC (pró-opiomelanocortina). O POMC liberado após essa sinalização é rapidamente clivado em alfa-MSH e β -endorfinas. O alfa-MSH é uma substância reconhecidamente anorexigênica, agindo nos receptores 3 e 4 de melanocortina (MC3R e

MC4R) que também aumentam o gasto energético. No entanto, o efeito isolado da bupropiona o peso do indivíduo não é tão pronunciado, pois a β -endorfina, opióides endógeno, produzida em conjunto com a alfa-MSH, inibe diretamente a via da POMC, numa retroalimentação de alça curta [24, 25]. Um excesso de β -endorfinas leva a um aumento do consumo alimentar em roedores, principalmente de alimentos mais palatáveis [26].

A naltrexona foi considerada para combater este feedback negativo de modo a alcançar uma maior perda de peso [22]. Ao inibir os receptores opióides, a naltrexona liberta os neurónios da POMC da inibição pela β -endorfina, potencializando a estimulação da via da POMC pela bupropiona [24, 25]. Além disso, a naltrexona parece reduzir as propriedades de prazer desencadeada por certos tipos de alimentos, através da interação com o sistema mesolímbico de recompensa [26].

Dentro desse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar, o efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre o comportamento alimentar e na expressão gênica dos receptores DRD_{1a} e DRD₂ no núcleo *acumbens* e estriado em ratos obesos, com o propósito de contribuir para o entendimento dos mecanismos neuronais envolvidos no comportamento alimentar.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Na colônia de criação, vinte e quatro horas após o nascimento dos filhotes, foi realizado o procedimento de sexagem, sendo a ninhada ajustada por 8 filhotes (proporção de 4 machos: 4 fêmeas) escolhidos aleatoriamente, considerando o peso entre 6 a 8g. As fêmeas foram utilizadas apenas para compor as ninhadas. Este dia foi considerado como o primeiro dia de vida dos filhotes. Os filhotes permaneceram com as mães até completarem 21 dias de idade, período no qual ocorreu o desmame. Após o desmame os animais foram submetidos à dieta padrão de biotério ou dieta de cafeteria conforme grupo experimental (Tabela 1). Durante todo o experimento os animais foram mantidos em condições padrão de biotério seguindo recomendação ética da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - SBCAL e das normas estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals [27] e todos os procedimentos foram aprovados de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE (nº 23076.053208/2014-57).

Peso corporal e consumo alimentar

O peso corporal dos animais foi verificado no 21º dia pós-natal (desmame) e logo após o período de adaptação ambiental e a dieta que durou oito dias, passou a ser verificado duas vezes por semana durante 78 dias após o início da ingestão das dietas experimentais pelos grupos normonutrido e obeso. Após este período, deu-se início ao tratamento farmacológico, e o peso dos animais passou a ser verificado diariamente pelo período de 14 dias, quando completaram 121 dias de vida.

O consumo alimentar diário, durante o tratamento, foi medido entre o 107º ao 121º dia de vida. Os animais dos grupos **normonutrido** (n=20) e **obeso** (n=20) foram alojados em gaiolas com no máximo 3 animais e formaram quatro subgrupos: **normonutrido sem tratamento (NST)** (n=10) que receberam ração comercial padrão de biotério Presence® e aplicação diária de injeção subcutânea de água destilada na dose de 1ml/kg; **normonutrido com tratamento (NCT)** (n=10) que receberam ração comercial padrão de biotério Presence® e aplicação diária de injeção subcutânea de NAL 1mg/kg e BUP 20mg/kg (Sigma-Aldrich® Toronto); **obeso sem tratamento (OST)** (n=10) que receberam dieta de cafeteria e aplicação diária de injeção subcutânea de água destilada (1ml/kg); **obeso com tratamento (OCT)** (n=10) que receberam dieta de cafeteria e aplicação diária de injeção subcutânea de NAL 1mg/kg e BUP 20mg/kg (Sigma-Aldrich® Toronto). O consumo alimentar foi obtido durante todo o experimento para cada tipo de dieta oferecida de acordo com cada grupo experimental e verificado pela diferença entre a quantidade de alimento oferecido e o rejeitado. Para as medidas do peso corporal e do consumo alimentar foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000®).

Índice de Lee e índice de massa corporal (IMC)

O índice de obesidade para roedores (Lee Index) foi calculado através do comprimento nasoanal e o peso corporal, onde: Índice de Lee = (raiz cúbica ($3\sqrt{\text{ }}$) do peso corporal (g) /comprimento nasoanal (cm) x 1000) [28]. O IMC, índice de adiposidade muito usado em ratos e que guarda relação positiva com o índice de Lee, foi determinado através da relação entre peso corporal (g) e o quadrado do comprimento nasoanal (cm²) [29]. Essas medidas foram realizadas antes do início e após o término do tratamento farmacológico, ou seja, aos 106º dias de vida e aos 121º dias de vida (após término do tratamento farmacológico) e antes da eutanásia dos animais.

Teste de Preferência a macronutrientes

Entre o 110º e 115º dia de vida, os animais do grupo normonutrido foram submetidos ao teste de preferência a dietas com predominância de macronutrientes (proteica, glicídica e lipídica) [30]. Antes de iniciar o teste, os animais foram colocados em gaiolas individuais para adaptação por 4 dias (a dieta e a gaiola) e formaram quatro subgrupos: NST (n=5), NCT (n=5), OST (n=5) e OCT (n=5). Após o período de adaptação, os animais receberam aplicação de injeção de água destilada (1ml/kg) ou da combinação de NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) por via subcutânea (conforme cada grupo experimental), e em seguida foi disponibilizado aos animais normonutridos 30g de dieta padrão (3,3 kcal/g) e 30g de cookie de chocolate (5,0 kcal/g) e aos animais obesos foi disponibilizado 30g da dieta de cafeteria (4,0 kcal/kg) e 30g de cookie de chocolate (5,0 kcal/g).

A ingestão (g) de cada dieta foi calculada como a diferença entre a quantidade da dieta fornecida e rejeitada, e foi pesada no início do experimento e em cada intervalo de tempo proposto para comparação, ou seja, a cada 12 horas do ciclo invertido (claro/escuro). Os resultados representam a ingestão média de macronutrientes predominantes na dieta para cada animal durante 24 horas do experimento. (Tabela 1).

Sequência Comportamental de Saciedade (SCS)

A sequência comportamental de saciedade (SCS) é um método não invasivo que consiste em avaliar, durante um intervalo de tempo, comportamentos alimentares e não alimentares com a finalidade de se determinar a saciedade. Este procedimento foi realizado segundo protocolo adaptado de Halford, e colaboradores [30]. Aos 110 dias, os animais de cada grupo experimental normonutridos [NST (n=8), NCT (n=8) e obesos OST (n=8), OCT (n=8)] foram, inicialmente, submetidos a uma breve privação alimentar de quatro horas para estimular a busca pelo alimento. Em seguida, foi ofertada 30g de dieta padrão de biotério ou dieta de cafeteria, e durante 60 minutos foi registrada a duração (em segundos) dos comportamentos de: **Alimentação:** O registro desse comportamento foi iniciado após o rato colocar-se junto ao comedouro iniciando o consumo do alimento, sendo finalizado quando o rato abandonou o comedouro. **Descanso:** Esse comportamento foi registrado quando o animal não estava se alimentando ou se limpando, ficando quieto, deitado na gaiola. **Limpeza:** O comportamento de limpeza é um comportamento estereotipado constituído por sub-comportamentos que ocorrem em uma sequência temporal definida. Iniciou-se com o lambar de patas anteriores e movimentos dessas sobre a cabeça, continuando a lambar a região ventral, dorso e patas posteriores. O alimento ofertado e rejeitado durante a SCS foi pesado e

protocolado e o ponto de saciedade determinado pelo ponto de cruzamento dos comportamentos que determinam o final da alimentação e início do descanso.

Durante a SCS foram avaliados ainda parâmetros microestruturais da alimentação como: ingestão de alimentos [alimento consumido (g) durante o tempo de observação da SCS], duração da refeição [tempo (s) durante todo o período de observação que o animal estava comendo alimentos], duração da limpeza [tempo durante todo o período de observação em que o animal estava de fato se limpando], duração do descanso [tempo durante todo o período de observação em que o animal estava descansando], taxa local de alimentação [quantidade de alimento consumido (mg)/duração da refeição (s)] e taxa de alimentação global [quantidade de alimento consumido (g)/análise da duração do SCS (min)].

Análise da massa relativa da gordura abdominal e gordura perigonadal

Após o processo de eutanásia dos animais, a gordura abdominal e gordura perigonadal foram retiradas e pesadas. Então foi realizado o cálculo da massa relativa dividindo-se o peso verificado da gordura (g) pelo peso corporal de cada animal no dia da coleta (121º dia), e multiplicando-se o resultado por 100. Tendo assim um resultado expresso em g/100 g de peso vivo (g/100g p.v.).

Isolamento do núcleo accumbens e estriado

Ao 122º dia de vida, os animais dos dois grupos experimentais foram eutanasiados. Os ratos foram previamente pesados e anestesiados com Isoflurano por via inalatória e imediatamente decapitados com guilhotina. Em seguida foi realizada a craniotomia para a remoção do encéfalo. O núcleo *accumbens* juntamente com o corpo estriado de cada hemisfério cerebral foram removidos e acondicionados juntos em criotubos de 1,5 ml devidamente identificados. Todo o material foi congelado em dióxido de carbono solidificado (gelo seco) e mantido em freezer à -80° C para posterior análise molecular por PCR em tempo real.

Expressão gênica da Tirosina hidroxilase e DRD_{1a} e DRD₂ no núcleo accumbens e no estriado

O RNA total do núcleo *accumbens* e estriado foi extraído utilizando 1ml do reagente QIAzol Lysis Reagent (Qiagen®, Hilden, Alemanha) conforme instruções do fabricante.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen®, Hilden, Alemanha). Foi preparada uma reação utilizando: 2µl gDNA Wipeout Buffer, 7×; amostras de RNA e água livre de RNases até 14µl para eliminação do DNA genômico. O mix de reação foi preparado utilizando: 1µl Quantiscript Reverse Transcriptase;

4µl Quantiscript RT Buffer, 5×; 1µl RT Primer Mix e 14µl da reação de eliminação.

A reação de PCR foi realizada usando o Kit SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen®, Hilden, Alemanha) e analisada em tempo real através do termociclador Rotor-Gene® HRM – 2 Plex Mix (Qiagen®, Hilden, Alemanha) para determinação da expressão do mRNA das amostras. O volume total da reação foi de 25µl, sendo: 12,5µl do composto fluorescente SYBR Green PCR Master Mix, 2µl do cDNA, 2,5µl para os primers forward e reverse e 5,5µl de água livre de RNases. As reações foram incubadas a 95°C por 5 min para a ativação da enzima DNA polimerase, seguido por 40 ciclos de 5'' a 95°C para desnaturação e de 10'' a 60°C para anelamento, extensão e coleta do sinal de fluorescência. As sequências dos primers utilizados para amplificação da enzima TH, DRD_{1a}, DRD₂ e β -actina estão descritos na tabela 2 e foram sintetizados e purificados por IDT – Integrated DNA Technologies (EUA). Os níveis de expressão relativa de mRNA de DRD_{1a} e DRD₂ e da enzima TH no núcleo *accumbens* e estriado, foram calculados através do método comparativo $\Delta\Delta CT$ (*threshold cycle*) [32], tendo a β -actina, como gene normalizador.

Análises estatísticas

Para as diferenças estatísticas foram utilizados os testes: t de *Student* para o consumo alimentar total antes e durante o tratamento, ANOVA de uma via seguido por Tukey pós-teste para as análises de expressão gênica da enzima TH, DRD_{1a} e DRD₂. Para os demais experimentos, utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido por Bonferroni pós-teste, exceto para a sequência comportamental de saciedade, e do teste de preferência a macronutrientes que utilizou ANOVA de duas vias, seguido por Tukey pós-teste. O nível de significância foi considerado p igual ou menor que 0,05. Todos os dados foram analisados usando o programa GraphPad PRISM® versão 7 (San Diego, USA).

Resultados

Avaliação do peso corporal antes do tratamento

O peso corporal dos animais normonutridos e obesos não apresentou diferença na 1ª, 2ª e 3ª semana após início do consumo das dietas experimentais. Os animais do grupo obeso quando comparados aos animais normonutridos apresentaram peso corporal maior a partir da 4ª semana ($225,2 \pm 15,73$ versus $256,82 \pm 22,42$) e na 5ª semana ($260,47 \pm 19,15$ versus $294,02 \pm 22,52$) com $p < 0,01$ e nas semanas subsequentes até a 11ª semana antes do início do tratamento ($347,05 \pm 27,06$ versus $421,98 \pm 48,57$) com $p < 0,0001$ [Fig. 1].

Efeito do uso combinado de NAL/BUP, após 14 dias de tratamento sobre o peso corporal e consumo alimentar

O uso combinado de NAL/BUP reduziu o peso corporal dos animais obesos OCT ($418,4 \pm 43,7$) em comparação ao peso inicial ($461,5 \pm 38,1$) $p < 0,05$. O peso corporal final dos animais obesos que não receberam tratamento OST ($467,5 \pm 24,8$) foi estatisticamente maior em comparação ao peso final dos animais obesos que foram tratados ($418,4 \pm 43,7$) $p < 0,05$. Não houve alteração significativa no peso corporal inicial e final dos animais normonutridos com tratamento e sem tratamento [Fig. 2].

O uso combinado de NAL/BUP reduziu o consumo médio total da dieta padrão nos animais do grupo normonutrido NCT ($4,52 \pm 0,39$) em comparação ao grupo NST ($4,88 \pm 0,25$) $p < 0,05$ [Fig.3B]. Nos animais obesos o uso combinado de NAL/BUP reduziu o consumo médio total da dieta de cafeteria nos animais do grupo OCT ($4,25 \pm 0,23$) em comparação aos animais do grupo OST ($5,74 \pm 0,36$) $p < 0,0001$ [Fig.3D].

Efeito do uso combinado de NAL/BUP após 14 dias de tratamento sobre o índice de Lee e o índice de Massa Corporal (IMC)

O uso combinado de NAL/BUP, reduziu significativamente o índice de Lee nos animais do grupo NCT ($317,2 \pm 15,6$) em comparação ao verificado antes do tratamento NCT ($334,4 \pm 19,6$) $p < 0,05$ [Fig. 4A] e do grupo OCT ($321,7 \pm 12,2$) em comparação ao verificado antes do tratamento ($344,4 \pm 13,7$) $p < 0,01$ [Fig. 4B]. Houve diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas após o tratamento entre o grupo OCT ($321,75 \pm 12,16$) e OST ($343,76 \pm 11,28$) $p < 0,05$ [Fig. 4B]. Não houve alteração nas medidas do índice de Lee nos animais do grupo NST ($330,6 \pm 5,7$ versus $323,5 \pm 11,9$) [Fig. 4A].

Não houve diferença estatisticamente significativa nas medidas do IMC nos animais do grupo normonutrido (NST e NCT) [Fig. 5A]. No entanto, o uso combinado de NAL/BUP reduziu significativamente o IMC nos animais obesos OCT ($0,77 \pm 0,08$) em comparação ao IMC verificado antes do tratamento OCT ($0,91 \pm 0,07$) $p < 0,01$ [Fig. 5B]. Houve diferença estatisticamente significativa nas medidas de IMC verificadas após o tratamento entre os grupos OCT ($0,77 \pm 0,08$) e OST ($0,90 \pm 0,08$) $p < 0,05$ [Fig. 5B].

Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre a preferência a macronutrientes

Durante o ciclo claro, o uso combinado de NAL/BUP aumentou significativamente a preferência por proteínas no grupo NCT ($2,52 \pm 1,73$) em comparação ao grupo NST ($0,16 \pm 0,11$) $p < 0,01$ [Fig.6A] e durante o ciclo escuro, NAL/BUP reduziu significativamente a

preferência por lipídeos no grupo NCT ($0,78 \pm 0,15$) em comparação ao grupo NST ($4,23 \pm 2,99$) $p < 0,05$ [Fig.6B]. Não houve diferença estatística significativa na preferência a carboidratos durante os ciclos claro ou escuro entre os grupos experimentais [Figs.6A e B].

Com relação ao consumo total de macronutrientes durante as 24 horas do teste, a combinação de NAL/BUP aumentou significativamente a preferência por proteínas no grupo NCT ($5,80 \pm 0,82$) em comparação ao grupo NST ($0,68 \pm 0,02$) $p < 0,0001$ [Fig.6C], reduziu significativamente a preferência por carboidratos no grupo NCT ($4,80 \pm 0,70$) em comparação ao grupo NST ($6,28 \pm 0,09$) $p < 0,0001$ [Fig.6C], reduziu significativamente a preferência por carboidratos no grupo OCT ($3,42 \pm 0,59$) em comparação ao grupo OST ($5,60 \pm 0,46$) $p < 0,0001$ [Fig.6C], reduziu significativamente a preferência por lipídeos no grupo NCT ($1,23 \pm 0,21$) em comparação ao grupo NST ($5,58 \pm 0,08$) $p < 0,0001$ [Fig.6C], e reduziu significativamente a preferência por lipídeos no grupo OCT ($2,95 \pm 0,51$) em comparação ao grupo OST ($4,97 \pm 0,40$) $p < 0,0001$ [Fig.6C].

Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre a sequência comportamental de saciedade e seus parâmetros

A sequência comportamental da saciedade (SCS), foi analisada em quatro grupos experimentais: normonutrido sem tratamento (NST), normonutrido com tratamento (NCT), obeso sem tratamento (OST) e obeso com tratamento (OCT). Nos animais normonutridos, o ponto de saciedade ocorreu aos 32 minutos no grupo NST e aos 24 minutos no grupo NCT, indicando aparecimento antecipado da saciedade nos animais normonutridos que receberam tratamento com NAL/BUP em comparação aos animais que não foram tratados [Figs.7A e 7B]. Nos animais obesos, o ponto de saciedade ocorreu aos 36 minutos no grupo OST e aos 7 minutos no grupo OCT, indicando desencadeamento mais precoce da saciedade nos animais obesos tratados com NAL/BUP em comparação aos que não foram tratados [Figs.7C e 7D].

O uso combinado de NAL/BUP reduziu a ingestão alimentar nos animais obesos tratados OCT ($0,60 \pm 0,88$) em comparação aos sem tratamento OST ($3,25 \pm 1,67$) $p < 0,01$, o que não foi observado no grupo normonutrido sem tratamento NST ($4,88 \pm 0,25$) comparado ao tratado NCT ($3,50 \pm 0,93$) $p > 0,05$. A associação NAL/BUP reduziu o tempo de duração da refeição no grupo OCT ($154,13 \pm 187,63$) em comparação a OST ($851,00 \pm 425,00$) $p < 0,001$ e aumentou a duração do descanso no grupo OCT ($1862,38 \pm 589,63$) em comparação a OST ($818,25 \pm 799,78$) $p < 0,05$. Não houve diferença estatística na taxa local e global de alimentação, nem na duração da limpeza entre os grupos experimentais $p > 0,05$ [Tabela 3].

Efeito do uso combinado de NAL/BUP, após 14 dias de tratamento, sobre a massa relativa da gordura perigonadal e abdominal

O tratamento com a associação reduziu as medidas de massa relativa de gordura perigonadal apenas nos animais obesos, onde os animais do grupo OCT ($3,64 \pm 0,66$) apresentaram as medidas de massa relativa da gordura perigonadal, menores em comparação com OST ($4,36 \pm 0,56$) $p < 0,05$. Não houve diferença significativa nas medidas no grupo normonutrido com tratamento NCT ($3,33 \pm 0,44$) comparado ao sem tratamento NST ($3,51 \pm 0,53$) $p > 0,05$ [Fig. 8A].

A massa relativa de gordura abdominal nos animais do grupo obeso sem tratamento OST ($4,06 \pm 0,52$) e com tratamento OCT ($2,83 \pm 1,16$) apresentaram maiores valores em comparação aos animais dos grupos normonutridos NST ($1,34 \pm 0,41$) e NCT ($1,34 \pm 0,59$). As diferenças são estatisticamente significativas com $p < 0,0001$ e $p < 0,001$, respectivamente. Os animais do grupo OCT apresentaram as medidas de massa relativa da gordura abdominal menores ($2,83 \pm 1,16$) em comparação com OST ($4,06 \pm 0,52$) $p < 0,01$. Não houve diferença nas medidas de NST ($1,34 \pm 0,41$) comparado a NCT ($1,34 \pm 0,59$) $p > 0,05$. [Fig. 8B].

Efeito do uso combinado de NAL/BUP, após 14 dias de tratamento sobre a expressão gênica da enzima TH e dos receptores DRD_{1a} e DRD₂ no núcleo accumbens (NAc) e no estriado

A eficiência da amplificação dos genes TH, DRD_{1a} e DRD₂ em relação ao gene normalizador β -actina, foi sistematicamente analisada usando amostras de cDNA de ambos os grupos normonutridos e obesos, tratados e não tratados. Ao analisar-se os animais que não foram tratados com a associação, onde o único fator a interferir foi a obesidade, não foi constatada diferença na expressão de TH no grupo normonutrido NST ($1,03 \pm 0,23$) em relação ao grupo obeso OST ($0,90 \pm 0,23$) $p > 0,05$ [Fig. 9A]. O mesmo ocorrendo para a expressão de DRD_{1a} em NST ($1,07 \pm 0,47$) versus OST ($0,96 \pm 0,35$) $p > 0,05$ [Fig. 9B] e de DRD₂ em NST ($1,08 \pm 0,52$) versus OST ($1,05 \pm 0,69$) $p > 0,05$ no NAc e estriado [Fig. 9B]. Quando foram analisados os efeitos do tratamento com a combinação de NAL/BUP sobre a expressão de TH, DRD_{1a} e DRD₂, observa-se aumento nos níveis de TH no grupo normonutrido tratado NCT ($1,89 \pm 0,64$) versus NST ($1,03 \pm 0,23$) $p < 0,05$ [Fig. 9A], assim como, no grupo obeso tratado OCT ($1,81 \pm 0,13$) versus NST ($1,03 \pm 0,23$) $p < 0,05$ [Fig. 9A], e em OCT ($1,81 \pm 0,13$) versus OST ($0,90 \pm 0,23$) $p < 0,001$ [Fig. 9A], não havendo, porém, diferença na expressão de TH no NAc e estriado, no grupo obeso tratado OCT ($1,81 \pm 0,13$) em relação ao normonutrido tratado NCT ($1,89 \pm 0,64$) $p > 0,05$ [Fig. 9A], assim também, na expressão de DRD_{1a} nos grupos NST ($1,07 \pm 0,47$) versus NCT ($1,35 \pm 0,63$) [Fig. 9B] $p > 0,05$; NCT ($1,35 \pm 0,63$) versus OCT ($0,89$

$\pm 0,48$) [Fig. 9B] $p > 0.05$; e OST ($0,96 \pm 0,47$) *versus* OCT ($0,89 \pm 0,48$) $p > 0.05$ [Fig. 9B]. No entanto, houve aumento na expressão de DRD₂ nos mesmos núcleos cerebrais nos grupos OCT ($2,37 \pm 0,44$) *versus* NST ($1,08 \pm 0,52$) $p < 0.01$ [Fig. 9C], em OCT ($2,37 \pm 0,44$) *versus* NCT ($1,31 \pm 0,29$) $p < 0.05$ [Fig. 9C], e em OCT ($2,37 \pm 0,44$) *versus* OST ($1,05 \pm 0,69$) $p < 0.01$ [Fig. 9C], porém entre animais normonutridos tratados ou não tratados, a expressão deste receptor manteve-se sem alteração [Fig. 9C].

Discussão

A ingestão excessiva de alimentos, especialmente os carboidratos e gorduras, é em grande parte responsável pela crescente incidência de obesidade em todo o mundo. É geralmente aceito que a quantidade de alimento consumido é determinada por dois mecanismos de controle [33]. O primeiro está relacionado à regulação da homeostase do equilíbrio energético e é impulsionado principalmente pelos centros de alimentação hipotalâmica [34]. O segundo mecanismo que regula a ingestão de alimentos está relacionado ao sistema de recompensa cerebral que consiste nas estruturas corticomesolímbicas, incluindo o núcleo *accumbens* e estriado, que utilizam como neurotransmissores a dopamina, opióides e endocanabinoides [35].

Alguns estudos correlacionais sugerem que o aumento da prevalência da obesidade está associado a uma mudança para maior consumo de dietas ricas em gordura e açúcar [36-38]. A pesquisa experimental apoia esses estudos, estabelecendo uma relação de causalidade entre o consumo prolongado de uma dieta com altos níveis de gordura e açúcar e a adiposidade [15, 39, 40]. De fato, os resultados do presente estudo mostraram que a dieta rica em gordura e açúcar (cafeteria) utilizada para indução da obesidade em ratos (DIO), mostrou-se bastante eficaz. Os animais do grupo obeso que se alimentaram com esse tipo de dieta apresentaram peso corporal estatisticamente maior quando comparados aos animais normonutridos.

Esses achados são consistentes com relatos anteriores da literatura, que confirmam que animais quando são expostos cronicamente a este tipo de dieta, resulta em ganho de peso, sensibilidade alterada à recompensa e alterações na via dopaminérgica e nos receptores D₂ [41]. Além disso, está bem fundamentado na literatura que DIO são mais palatáveis e resultam em hiperfagia [39, 42], e em aumento da gordura corporal [15, 39-43].

A combinação de NAL/BUP é uma terapia de obesidade que foi desenvolvida através de pesquisas sobre as vias neurais que regulam a ingestão de alimentos e desta forma, interferem no equilíbrio homeostático e no gasto energético [44, 45], bem como no controle do comportamento alimentar [46]. De fato, estudos pré-clínicos e clínicos com NAL/BUP indicam

que esses agentes podem atuar nas vias homeostáticas e hedônicas para influenciar a redução da ingestão de alimentos e promover redução do peso corporal [47].

Neste estudo, investigamos o efeito do uso combinado de NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg), sobre o comportamento alimentar, sendo analisados alguns indicadores importantes para verificar a ação desta combinação farmacológica em ratos *wistar* obesos.

Os resultados demonstraram que a combinação de NAL/BUP durante 14 dias de tratamento promoveu redução do peso corporal nos animais obesos em comparação ao peso corporal verificado antes do início do tratamento. O peso final dos animais obesos tratados também foi menor quando comparado ao peso final dos animais obesos não tratados. Além disso, não houve alteração no peso em animais normonutridos. A combinação de NAL/BUP também promoveu redução significativa no consumo alimentar (Kcal/g), tanto nos animais normonutridos quanto nos animais obesos em comparação a seus grupos controles.

Esses resultados são consistentes com investigações anteriores de Clapper e colaboradores [20], no qual foi demonstrado em ratos DIO, que a combinação de NAL/BUP reduziram a ingestão de alimentos, peso corporal e adiposidade sem perda de massa magra. De fato, a coadministração de NAL/BUP produz além da redução significativa do peso, uma maior redução na ingestão de alimentos que é comparável aos efeitos agregados de cada medicamento [24, 48]. Em ratos DIO, que são obesos após manutenção a longo prazo em uma dieta rica em gordura, a NAL e a BUP sistêmicas reduzem a ingestão alimentar de forma independente e a combinação produz uma redução sinérgica [24].

Realmente, a combinação de NAL/BUP demonstrou uma redução maior e possivelmente sinérgica na ingestão de alimentos em ratos obesos em comparação com ratos não obesos. Uma possível interpretação desta descoberta é que a atividade basal dos neurônios POMC é menor em ratos obesos, possivelmente devido à resistência à leptina induzida pela obesidade em neurônios POMC [49, 50].

Além da perda de peso e redução do consumo, o uso combinado de NAL/BUP também promoveu reduções nas medidas dos índices de adiposidade. Animais obesos apresentaram reduções significativas no índice de Lee e IMC comparados com as medidas verificadas antes do tratamento. Com resultados semelhantes, Wright e Rodgers, constataram que, além da redução da ingestão de alimentos e do peso corporal, a combinação de NAL/BUP também promove perda de massa gordurosa em ratos DIO [48]. Além disso, Wang e colaboradores, afirmam que a perda significativa de peso corporal e do consumo alimentar, bem como dos índices de adiposidade observados através do uso combinado de NAL/BUP devem estar associada, em parte, à estimulação de neurônios hipotalâmicos de pro-opiomelanocortina

(POMC) pela bupropiona, que também promove a auto inibição da POMC, que é bloqueada pela ação da naltrexona, mediada por receptores opióides, porém os mecanismos neurobiológicos não são totalmente compreendidos [51].

Evidências na literatura sugerem que a obesidade está associada a alteração no comportamento alimentar, o que leva a alta ingestão de energia e a preferência por alimentos saborosos [49]. Acredita-se, que a escolha da comida é impulsionada pela preferência alimentar, que é influenciada por fatores ambientais e internos, desde a disponibilidade até propriedades gratificantes dos alimentos [52-55]. De fato, há relatos que confirmam que os alimentos altamente palatáveis ativam o sistema de recompensas para afetar o comportamento alimentar [56]. Do ponto de vista evolutivo, esses alimentos com alto teor de lipídeos e carboidratos são mais atraentes porque podem ser rapidamente convertidos em energia [57].

Neste estudo, investigamos o efeito da combinação NAL/BUP sobre a preferência por proteínas, carboidratos e lipídeos predominantes na dieta padrão, dieta de cafeteria e no cookie de chocolate. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que se propôs investigar a preferência a macronutrientes em ratos que foram submetidos a tratamento pela combinação de NAL/BUP. Os resultados indicaram que o tratamento com a combinação de NAL/BUP promoveu em animais normonutridos, aumento da preferência por proteínas, que ocorreu principalmente no ciclo claro, além de redução da preferência por lipídeos, que ocorreu principalmente no ciclo escuro, e de carboidratos. Nos animais obesos, o tratamento combinado de NAL/BUP promoveu redução significativa da preferência por carboidratos e lipídeos durante as 24 horas do teste.

Esses resultados são consistentes com relatos de estudos anteriores que mostram que a naltrexona influencia as vias de recompensa neural e o comportamento alimentar. De fato, há relatos que indicam que a naltrexona atua no NAc e área tegumentar ventral, para promover diminuição da preferência por alimentos altamente saborosos, especialmente alimentos com alto teor de gordura e açúcar [58-61], de gordura e proteína [62, 63], além de atuar na preferência por determinados tipos de sabores [64, 65].

Nas pesquisas que avaliam o apetite sob interferências de fármacos, estas frequentemente avançam para ensaios clínicos com base no resultado (redução da ingestão de alimentos/diminuição de peso corporal) com atenção insuficiente ao processo (análise comportamental). Embora a NAL/BUP (sozinhas e em combinação) reduzam o consumo de alimentos em ratos e humanos, seus efeitos sobre o comportamento durante os testes de alimentação foram poucos investigados [19, 24, 25, 48, 66].

O conceito de sequência comportamental de saciedade (SCS) refere-se à progressão

ordenada do comportamento dentro de um teste de alimentação, observando parâmetros que vão desde a limpeza até o descanso [67]. Os fármacos anoréxicos que perturbam a SCS são considerados como inibidores da ingestão de alimentos, atuando através de meios indiretos, enquanto aqueles que preservam a SCS, mas a aceleraram, atuam diretamente nos mecanismos de regulação do apetite [68, 69]. Como a integridade estrutural da SCS pode ser preservada por alguns agentes anoréxicos, mas interrompida por outros, a SCS reflete o processo de saciedade e não a simples cessação da alimentação [70]. As drogas que atuam especificamente induzindo a saciedade devem, portanto, produzir uma sequência ordenada de comportamentos pós-consumo com uma interrupção prematura do consumo e início prematuro do repouso, ou seja, uma aceleração na sequência comportamental de saciedade [48].

Neste estudo, investigamos o efeito da combinação de NAL/BUP sobre os aspectos comportamentais da alimentação em ratos normonutridos e obesos, utilizando o método da SCS. Os resultados mostraram que a combinação de NAL/BUP promoveu antecipação da saciedade, tanto em animais normonutridos quanto em obesos, em comparação aos animais não tratados, entretanto, o disparo da saciedade foi mais antecipado nos animais obesos do que nos animais normonutridos.

Com relação aos parâmetros da SCS, os resultados indicaram que o uso combinado de NAL/BUP promoveu em animais obesos, redução da ingestão alimentar, redução da duração da refeição, e aumento da duração do descanso. Não houve alterações nos outros parâmetros avaliados da SCS nos grupos experimentais.

Do ponto de vista fisiológico, a saciedade pode ser definida como a falta de fome e a sensação de plenitude depois de comer a quantidade de alimento suficiente para restaurar o equilíbrio energético. Embora intimamente relacionado com o comportamento associado ao apetite, a saciedade é conduzida por centros cerebrais e neurotransmissores diferentes dos responsáveis pelo controle da fome. Além disso, os mesmos estímulos periféricos afetam de forma diferente a atividade dos centros de fome e saciedade [71].

A taxa de alimentação é um parâmetro amplamente utilizado na literatura como um indicador sensível da ação da droga sobre o comportamento alimentar [31]. Esta taxa indica a velocidade a que o animal se alimenta [31]. No nosso trabalho, a combinação de NAL/BUP promoveu redução no consumo do alimento sem alterar a taxa de alimentação e consequentemente precisou de menos tempo comendo para o aparecimento da saciedade. Como não houve alteração no comportamento de limpeza, o descanso também durou mais quando o disparo da saciedade foi antecipado [72].

Estudo recente de Wright e colaboradores [48], investigaram os efeitos de NAL/BUP,

(sozinho ou em combinação) sobre o comportamento no contexto da alimentação, e constataram que, a bupropiona isoladamente reduziu a ingestão de alimentos e o tempo de alimentação em ratos, embora esses efeitos tenham sido acompanhados por aumento da atividade locomotora e redução no repouso. Já a naltrexona, isoladamente também reduziu a ingestão de alimentos, embora associada a reduções em vários elementos ativos e aumento no tempo de repouso, acelerando discretamente os perfis da SCS. Com relação a combinação NAL/BUP, resultou em um efeito anorético, com análises comportamentais que indicaram uma atenuação induzida por naltrexona dos efeitos psicoestimulantes da bupropiona e uma normalização resultante da SCS.

Wright e colaboradores [48], sugerem que seus achados sobre os efeitos da combinação de NAL/BUP no perfil comportamental da SCS são indicativos de uma interação aditiva e não sinérgica, ao contrário de outros trabalhos como o de Greenway e colaboradores [66], que sugerem que a combinação NAL/BUP é teorizada para trabalhar sinergicamente no hipotálamo e envolve os sistemas opióides e dopaminérgico para promover a saciedade, reduzir a ingestão de alimentos e aumentar o gasto energético [47, 66], entretanto, como dito anteriormente, o mecanismo neuroquímico exato da combinação NAL/BUP que leva à perda de peso ainda não está totalmente compreendido [73, 74].

Neste trabalho, foi observado que as medidas de massa de gordura perigonadal e gordura abdominal nos animais obesos, foram significativamente maiores quando comparadas a dos animais normonutridos, independentemente do tratamento. Esses dados refletem o ganho de peso observado nos animais obesos, que foram alimentados com dieta hiperlipídica (cafeteria), no qual se correlacionou positivamente com os aumentos do índice de Lee e do IMC relatados anteriormente neste trabalho. Resultados semelhantes observados por Bernardes e colaboradores [75], mostram que a quantidade de tecido adiposo abdominal e epididimal foi maior em ratos *wistar* que ingeriram dieta hiperlipídica por 15 semanas.

Neste trabalho, investigamos o efeito do uso combinado de NAL/BUP durante 14 dias, sobre as medidas de massa relativa da gordura perigonadal e gordura abdominal em ratos em ratos que foram submetidos a dieta hiperlipídica por 13 semanas. Os resultados mostraram que a combinação de NAL/BUP promoveu redução significativa na massa relativa de gordura perigonadal e na gordura abdominal, em comparação com os animais obesos não tratados. NAL/BUP também não alterou as medidas de massa relativa da gordura perigonadal e gordura abdominal em animais normonutridos.

Os achados deste trabalho confirmam relatos anteriores da literatura, que sugerem que a combinação de NAL/BUP resulta em perda de peso e uma maior redução na gordura corporal e da massa da gordura visceral do que o placebo e as monoterapias (NAL ou BUP). Além disso,

a redução observada foi proporcional à perda de peso, embora a perda de peso com NAL/BUP não foi associada a uma maior redução relativa na massa magra do que o placebo ou as monoterapias [76].

Outro relato semelhante, descreve que a perda de peso a longo prazo (>8 semanas) produzem uma redução na adiposidade total e visceral seguindo o padrão e grau de perda de peso geral [77]. Foi visto que as melhoras na sensibilidade à insulina, triglicerídeos e pressão sanguínea, estão associadas à perda de massa de gordura visceral [78,79]. Assim como no nosso trabalho, a perda de peso com a combinação NAL/BUP em adultos obesos, é atribuída em grande parte devido a uma redução na gordura corporal e adiposidade visceral e não devido à perda de tecido magro. Estes efeitos da NAL/BUP na adiposidade visceral provavelmente contribuem para as melhorias nas medidas de risco cardiológicos associados à combinação NAL/BUP [24, 80].

A sinalização de dopamina está implicada no "querer" ou no desejo por determinados alimentos que sobrepõe a necessidade metabólica [81]. O sentimento de prazer "gostar" está associado a estímulos gratificantes e é modulado pela sinalização de opióides [82, 83]. Os compostos de opióides, particularmente aqueles seletivos para o receptor μ -opióides dentro do núcleo *accumbens* e estriado, induzem um aumento potente na ingestão alimentar [16].

A naltrexona é um antagonista do receptor opióides e a bupropiona é um inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina. Evidências pré-clínicas sugerem que a bupropiona demonstra aumentar a ativação de POMC [84-87], enquanto a naltrexona diminui a auto inibição da via POMC por opióides endógenos, levando a uma ativação sinérgica [65, 87, 88]. Além disso, pensa-se que naltrexona e a bupropiona influenciam a via de recompensa dopaminérgica mesolímbica, que normalmente contribui para o reforço dos comportamentos, incluindo a alimentação [80, 90]. A combinação de NAL/BUP pode, portanto, também aumentar o gasto energético e reduzir a ingestão alimentar baseada em recompensas [91].

Nesse trabalho, foi investigado o efeito do uso combinado de NAL/BUP durante 14 dias de tratamento, sobre a expressão gênica da Tirosina Hidroxilase (TH), e de receptores dopaminérgicos DRD_{1a} e DRD₂ no núcleo *accumbens* e estriado de ratos normoalimentados e obesos. No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que se propôs investigar os efeitos do tratamento com a utilização da combinação de NAL/BUP, através de análise molecular, dos níveis da enzima TH e de receptores dopaminérgicos (D₁ e D₂) em áreas do cérebro envolvidas no controle do comportamento alimentar.

Primeiramente investigamos se as alterações nos níveis de expressão gênica de TH, DRD_{1a} e DRD₂ no núcleo *accumbens* e estriado, seriam uma resposta provocada pela obesidade

(ou do histórico nutricional) ou pelo tratamento com a combinação de NAL/BUP. Para esse fim avaliamos o efeito da dieta (padrão ou cafeteria) sobre os níveis de expressão gênica de TH, DRD_{1a} e DRD₂ no núcleo *accumbens* e estriado nos animais que não foram tratados. Os resultados mostraram que não houve alteração nos níveis de TH, DRD_{1a} e DRD₂, entre os grupos obesos e normonutridos, embora tenha sido observado um discreto aumento, não foi estatisticamente significativo. Uma consideração relevante é a importância relativa do consumo da dieta de cafeteria *versus* a obesidade resultante. Em nosso estudo e outros [15, 39, 54], não é possível distinguir quais desses estímulos (dieta ou condição corporal) poderiam impulsionar as mudanças na expressão de genes relacionados a dopamina. No entanto, em outros estudos [14, 92, 93], observam-se alterações dopaminérgicas em animais alimentados com uma dieta de cafeteria na ausência de obesidade, sugerindo que o consumo da dieta de cafeteria em vez da obesidade e alterações fisiológicas associadas, é suficiente para alterar a função do sistema dopaminérgico [15]. Outros estudos confirmam achados anteriores, indicando que dietas com alto teor de gordura, em comparação com as dietas controle, podem alterar diretamente o controle dopaminérgico do comportamento alimentar, em áreas do sistema de recompensa, reduzindo a densidade dos receptores D₂ no estriado [39], reduzindo a dopamina no núcleo *accumbens* [43] e reduzindo a expressão gênica de receptores D₂ na área tegumentar ventral (VTA) [15].

Neste trabalho, investigou-se os efeitos do uso combinado de NAL/BUP sobre a expressão gênica de TH, no núcleo *accumbens* e estriado de animais dos grupos experimentais e os resultados indicaram que o tratamento combinado de NAL/BUP promoveu aumento significativo dos níveis de expressão de TH no núcleo *accumbens* e estriado, tanto no grupo normonutrido (tratado *versus* não tratado) quanto no grupo obeso (tratado *versus* não tratado), entretanto, não houve diferença no grupo obeso (tratado) em comparação ao grupo normonutrido (tratado). Esses achados sugerem que o tratamento combinado de NAL/BUP altera o nível de expressão de TH no núcleo *accumbens* e estriado, independente do histórico nutricional.

De fato, a tirosina hidroxilase é conhecida por ser uma enzima limitante sobre a taxa da síntese de dopamina, neurotransmissor chave na regulação da ingestão de alimentos [94]. Estudos na literatura fornecem evidências que essa enzima se encontra alterada, apresentando baixo nível em animais e humanos obesos. De fato, há relatos que ratos obesos alimentados com dieta de alto teor de gordura, apresentaram nível de expressão gênica da enzima TH significativamente menor no hipotálamo ventromedial (VMH), substância negra (SN) e na área tegumentar ventral (VTA) em comparação com os controles. Entretanto, os autores afirmam

que esta diminuição nos níveis de TH observada nos ratos, possa ser possivelmente uma resposta adaptativa à superestimulação crônica da via mesolímbica [94].

Neste trabalho, investigou-se também o efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre os níveis de expressão de DRD_{1a} e de DRD₂ no núcleo *accumbens* e estriado de ratos normonutridos e obesos, no entanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de DRD_{1a} em nenhum dos grupos experimentais analisados.

Com relação a DRD₂, os resultados demonstram que o tratamento combinado com NAL/BUP promoveu aumento significativo na expressão de DRD₂ no núcleo *accumbens* e estriado em animais obesos (tratados versus não tratados). A diferença nos níveis de expressão de DRD₂ também foi maior no núcleo *accumbens* e estriado do grupo obeso (tratado) em comparação ao grupo normonutrido (tratado) entretanto não houve diferença no grupo normonutrido (tratado versus não tratado). Essas descobertas sugerem que o tratamento com NAL/BUP aumenta os níveis de DRD₂ no núcleo *accumbens* e estriado de animais em ambas condições nutricionais (normonutrido ou obeso) comparados aos animais que não foram tratados, no entanto, quando a comparação é feita apenas com animais tratados, o efeito do tratamento com NAL/BUP se mostra relativamente maior em animais obesos em relação aos normonutridos. Ou seja, o histórico nutricional interfere no nível de expressão de DRD₂ no núcleo *accumbens* e estriado, ao contrário do aconteceu com a enzima TH, onde nossos achados atuais indicaram que não houve essa interferência.

As primeiras ênfases científicas mostraram que a estimulação dos receptores D₂ levou a redução na quantidade de alimentos ingeridos por animais, e sua disfunção, um aumento na ingestão alimentar [15, 39, 95]. Evidências na literatura comprovam, que tanto os receptores D₁ quanto os receptores D₂ estão intimamente associados com o controle da ingestão de alimentos. Entretanto, estudos mais recentes sugerem que esses receptores se encontram alterados, em níveis mais baixos, em ratos obesos. De fato, há relatos de redução no nível da expressão receptor de dopamina D₂ [15, 39, 96, 97], de redução de dopamina extracelular no estriado [48] e de receptores D₁ no núcleo *accumbens* [15, 96]. No entanto, alguns estudos realizados em humanos obesos, forneceram resultados conflitantes. Enquanto alguns demonstraram baixa disponibilidade de receptores de dopamina D₂ no estriado [6, 15, 39, 96, 97], outros apresentaram disponibilidade de receptores de dopamina D₂ no estriado inalterada [98-100].

Coletivamente, nossas descobertas ampliam os resultados de experiências discutidas anteriormente e coincidem com as evidências de que a redução do apetite e a perda de peso induzidas pelo tratamento com NAL/BUP, produzem aumento da atividade da dopamina em áreas envolvidas com o sistema de recompensa, (ocasionado principalmente pela inibição da

recaptação da dopamina) que como consequência eleva o nível da enzima tirosina hidroxilase (aumentando a síntese de dopamina) e de receptores dopaminérgicos DRD₂ no núcleo *accumbens* e no estriado de ratos. No entanto, os mecanismos pelos quais o uso combinado de NAL/BUP impulsionam as mudanças dos níveis de expressão gênica na via dopaminérgica do comportamento alimentar em resposta a dieta e/ou obesidade, ainda permanece pouco esclarecido e necessita de estudos mais aprofundados. Portanto, considerando ser este o primeiro trabalho realizado neste sentido, se faz necessário investigações mais detalhadas e aprofundadas, buscando um maior entendimento das bases neurobiológicas e comportamentais associadas aos efeitos produzidos por essa associação sobre as vias relacionadas ao consumo alimentar hedônico e homeostático.

Conclusões

O uso combinado de NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) promove aumento nos níveis de expressão gênica da enzima TH e de receptores DRD₂ no núcleo *accumbens* e no estriado e altera o comportamento alimentar de ratos obesos, promovendo redução no consumo alimentar, principalmente de alimentos densamente energéticos, o que contribui para a perda do peso corporal.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo auxílio financeiro através do edital N° APQ-0729-4.01/15, ao Biotério do departamento de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco, ao departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco.

Referencias

1. Wharton S, Lee J, Christensen RA. **Weight loss medications in Canadá: a new frontier or a repeat of past mistakes?** *Diabetes Metab Syndr Obes*, 10 (2017), pp. 413-417.
2. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. **Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030.** *Int J Obes (Lond)*, 32 (2008), pp. 1431-7.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Media Centre Obesity and Overweight. Fact Sheet**, N° 311. Updated March. (2011).
4. Nissen LP, Vieira LH, Bozza LF, Veiga LT, Biscaia BFL, et al. **Intervenções para tratamento da obesidade: revisão sistemática.** *Rev bras med fam comunidade. Florianópolis*, 7 (2012), pp. 184-90.
5. Carnell S, Gibson C, Benson L, Ochner CN, Geliebter A. **Neuroimaging and obesity: current knowledge and future directions**, *Obes Rev*, 13 (2012), pp. 43–56.
6. Weijer BA, van de Geissen E, van Amelsvoort TA, Braak B, Janssen IM, et al. **Lower striatal dopamine D2/3 receptor availability in obese compared with non-obese subjects**, *EJNMMI Research*, 1 (2011), p. 37.
7. Oliveira LS, Silva LP, Silva AI, Magalhães CP, Souza SL, Castro, RM. **Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats.** *Behavioural Processes (Print)*, 86 (2011), pp. 119-124.
8. Berridge, KC, Kringelbach ML. **Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals.** *Psychopharmacology (Berl)*, 199 (2008), pp. 457-80.
9. Yamamoto, T. **Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain.** *Arch Histol Cytol*, 69 (2006), pp. 243-55.
10. Beaulieu JM; Gainetdinov RR. **The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors.** *Pharmacological Reviews*, 63 (2011), pp. 182-217.
11. Meguid MM, Fetissov SO, Varma M, Sato T, Zhang L, et al. **Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake.** *Nutrition*, 16 (2000), pp. 843–857.
12. Volkow ND, Wang GJ, Baler RD. **Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity.** *Trends Cogn. Sci*, 15 (2011), pp. 37–46.
13. Rada P, Avena NM, Hoebel BG. **Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell.** *Neuroscience*, 134 (2005), pp. 737–744.
14. Rada P, Bocarsly ME, Barson JR., et al. **Reduced accumbens dopamine in Sprague-Dawley rats prone to overeating a fat-rich diet.** *Physiol. Behav*, 101 (2010), pp. 394–400.
15. Vucetic Z, Carlin JL, Totoki K, et al. **Epigenetic dysregulation of the dopamine system in diet-induced obesity.** *J Neurochem*, 120 (2012), pp. 891–898.

16. Kelley AE, Berridge KC. **The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs.** J Neurosci, 1; 22(2002), pp. 3306-11.
17. Corbit LH, Muir JL, Balleine BW. **The role of the nucleus *accumbens* in instrumental conditioning: Evidence of a functional dissociation between *accumbens* core and shell.** J Neurosci, 21 (2001), pp. 3251-60.
18. Baldwin AE, Sadeghian K, Kelley AE. **Appetitive instrumental learning requires coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the medial prefrontal cortex.** J Neurosci, 22 (2002), pp. 1063-71.
19. Wadden TA, Foreyt JP, Foster GD et al. **Weight loss with naltrexone SR/bupropion SR combination therapy as an adjunct to behavior modification: the COR-BMOD trial.** Obesity, 19 (2011), pp. 110–120.
20. Clapper JR. et al. **Effects of amylin and bupropion/naltrexone on food intake and body weight are interactive in rodents models.** Eur. J. Pharmacol. 698 (2013), pp. 292-298.
21. Faria AM, Mancini MC, Melo ME, Cercato C, Halpern A. **Progressos recentes e novas perspectivas em farmacoterapia da obesidade.** Arq. Bras. Endocrinol. Metabol, 54 (2010), pp. 516–529.
22. Powell G, Apovian CM, Aronne LJ. **New drug targets for the treatment of obesity.** Clin. Pharmacol. Ther. 90 (2011), pp. 40–51.
23. Simpson KA, Martin NM, Bloom SR. **Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications.** Arq Bras Endocrinol Metabol, 53(2009), pp. 120-8.
24. Greenway FL, Dunayevich E, Tollefson G, *et al.* NB-201 Study Group. **Comparison of combined bupropion and naltrexone therapy for obesity with monotherapy and placebo.** J Clin Endocrinol Metab, 94 (2009), pp. 4898-906.
25. Padwal R. **Contrave, a bupropion and naltrexone combination therapy for the potential treatment of obesity.** Curr Opin Investig Drugs, 10 (2009), pp. 1117-25.
26. National Research Council. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**, 7th ed. Washington, DC: National Academy Press, (1996).
27. Kennett, G, Clifton PG. **New approaches to the pharmacological treatment of obesity: can they break through the efficacy barrier?** Pharmacol. Biochem. Behav, 97 (2010), pp. 63–83.
28. Bernardis LL, Patterson BD. **Correlation between ‘Lee index’ and carcass 1130 fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions.** Journal of 1131 Endocrinology, 40 (1968), p. 527.
29. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, et al. **Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats.** Lab Anim, 41 (2007), pp. 111-9.

30. Silva MC, Souza JÁ, Santos LO, Pinheiro IL, Borba TKF, Silva AAM, Castro RM, Souza SL. **Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats.** *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* (Print), 5 (2014), pp 219-228.
31. Halford JC. et al. **Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 61 (1998), pp. 159–168.
32. Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method.** *Methods*, 25 (2001), pp. 402-8.
33. Schneeberger M, Gomis R, Claret M. **Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance.** *J. Endocrinol*, 220 (2014), pp. 25-46.
34. Chambers AP, Sandoval DA, Seeley RJ. **Integration of satiety signals by the central nervous system.** *Curr. Biol*, 23 (2013), pp. 379-388.
35. Egecioglu E, Skibicka KP, Hansson C, et al. **Hedonic and incentive signals for body weight control.** *Rev. Endocr. Metab. Disord*, 12 (2011), pp. 141-151.
36. Dong D, Bilger M, van Dam RM, et al. **Consumption of specific foods and beverages and excess weight gain among children and adolescents.** *Health Aff*, 34 (2015), pp. 1940–1948.
37. Nielsen SJ, Siega-Riz AM, Popkin BM. **Trends in energy intake in U.S. between 1977 and 1996: Similar shifts seen across age groups.** *Obes Res*, 10 (2002), pp. 370–378.
38. St-Onge MP, Keller KL and Heymsfield SB. **Changes in childhood food consumption patterns: A cause for concern in light of increasing body weights.** *Am J Clin Nutr*, 78 (2003), pp.1068–1073.
39. Johnson PM and Kenny PJ. **Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats.** *Nat Neurosci*, 13 (2010), pp. 635–641.
40. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, et al. **A controlled high fat diet induces an obese syndrome in rats.** *J Nutr*, 133 (2003), pp. 1081–1087.
41. Robertson, SH, Rasmussen, EB. **Effects of cafeteria diet on delay discounting in adolescent and adults rats: Alterations in dopaminergic sensitivity.** *J Psychopharmacol*, 31 (2017), pp. 1419–1429.
42. Kanarek RB and Orthen-Gambill N. **Differential effects of sucrose, fructose, and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats.** *J Nutr*, 112 (1982), pp. 1546–1554.
43. Geiger BM, Haburcak M, Avena NM, et al. **Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity.** *Neuroscience*, 159 (2009), pp. 1193–1199.
44. Horvath TL. **The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus.** *Nat Neurosci*, 8 (2005), pp. 561–5.

45. Major GC, Doucet E, Trayhurn P, Astrup A, Tremblay A. **Clinical significance of adaptive thermogenesis.** *Int J Obes (Lond)*, 31 (2007), pp. 204–12.
46. Hill AJ. **The psychology of food craving.** *Proc Nutr Soc*, 66 (2007), pp. 277–85.
47. Billes SK, Greenway FL. **Combination therapy with naltrexone and bupropion for obesity.** *Expert Opin Pharmacother*, 12 (2011), pp. 1813–26.
48. Wright FL, Rodgers RJ. **Acute behavioural effects of bupropion and naltrexone, alone and in combination, in non-deprived male rats presented with palatable mash.** *Psychopharmacology (Berl)*, 228 (2013), pp. 291–307.
49. Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. **Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice.** *Endocrinology*, 145 (2004), pp. 4880–4889.
50. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, et al. **Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons.** *Cell Metab*, 5 (2007), pp. 181–194.
51. Wang, G.-J, Tomasi D, Volkow ND, Wang R, et al. **Effect of combined naltrexone and bupropion therapy on the brain's reactivity to food cues.** *International Journal of Obesity*, 38 (2014), pp. 682–688.
52. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, et al. **Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet.** *Obesity (Silver Spring, Md)*, 19 (2011), pp. 1109–1117.
53. Lindberg MA, Dementieva J, and Cavender J. **“Why has the BMI gone up so drastically in the last 35 years?”** *Journal of Addiction Medicine*, 5 (2011), pp. 272–278.
54. Volkow ND, O'Brien CP. **Issues for DSM-V: should obesity be included as a brain disorder?** *Am. J. Psychiatry*, 164 (2007), pp. 708–710.
55. Tarragon E, Moreno JJ. **Role of Endocannabinoids on Sweet Taste Perception, Food Preference, and Obesity-related Disorders,** *Chemical Senses*, 43 (2017), pp. 3–16.
56. Pelchat ML. **“Of human bondage: food craving, obsession, compulsion, and addiction,”** *Physiology & Behavior*, 76 (2002), pp. 347–352.
57. Nesse RM, Berridge KC., **“Psychoactive drug use in evolutionary perspective,”** *Science*, 278 (1997), pp. 63–66.
58. Taber MT, Zernig G, Fibiger HC. **Opioid receptor modulation of feeding-evoked dopamine release in the rat nucleus accumbens,** *Brain Res.* 785 (1998), pp. 24–30.
59. Taha SA, Norsted E, Lee LS, Lang PD, Lee BS, Woolley JD, et al. **Endogenous opioids encode relative taste preference.** *Eur J Neurosci*, 24 (2006), pp. 1220–6.
60. Zhang M, Gosnell BA, Kelley AE. **Intake of high-fat food is selectively enhanced by mu opioid receptor stimulation within the nucleus accumbens.** *J Pharmacol Exp Ther*, 285 (1998), pp. 908–14.

61. Shin AC, Pistell PJ, Phifer CB, Berthoud HR. **Reversible suppression of food reward behavior by chronic mu-opioid receptor antagonism in the nucleus accumbens.** *Neuroscience*, 170 (2010), pp. 580–8.
62. Yeomans MR, Gray RW. **Selective effects of naltrexone on food pleasantness and intake.** *Physiol. Behav*, 60 (1996), pp. 439–446.
63. Langleben DD, Busch EL, O'Brien CP, Elman I. **Depot naltrexone decreases rewarding properties of sugar in patients with opioid dependence.** *Psychopharmacology*, 220 (2012), pp. 559–564.
64. Woolley JD, Lee BS, Fields HL. **Nucleus accumbens opioids regulate flavor-based preferences in food consumption.** *Neuroscience*, 143 (2006), pp. 309–17.
65. Bonacchi KB, Ackroff K, Touzani K, Bodnar RJ, Sclafani A. **Opioid mediation of starch and sugar preference in the rat.** *Pharmacol Biochem Behav*, 96 (2010), pp. 507–14.
66. Greenway FL, Whitehouse MJ, Guttadauria M, et al. **Rational design of a combination medication for the treatment of obesity,** *Obesity (Silver Spring)*, 17 (2009), pp. 30–9.
67. Bigliardi PL, Stammer H, Jost G, Rufli T, et al. **Treatment of pruritus with topically applied opiate receptor antagonist.** *J Am Acad Dermatol*, 56 (2007), pp. 979–88.
68. Bigliardi-Qi M, Gaveriaux-Ruff C, Pfaltz K, Bady P, et al. **Deletion of μ - and κ -opioid receptors in mice changes epidermal hypertrophy, density of peripheral nerve endings, and itch behavior.** *J Invest Dermatol*, 127 (2007), pp. 1479–88.
69. Bodnar RJ. **Endogenous opioids and feeding behavior: a 30-year historical perspective.** *Peptides*, 25 (2004), pp. 697–725.
70. Blundell JE, Rogers PJ, Hill AJ. **Behavioural structure and mechanisms of anorexia: calibration of natural and abnormal inhibition of eating.** *Brain Res Bull*, 15 (1985), pp. 371–376.
71. Bojanowska E, Ciosek J. **Can We Selectively Reduce Appetite for Energy-Dense Foods? An Overview of Pharmacological Strategies for Modification of Food Preference Behavior.** *Current Neuropharmacology*, 14 (2016), pp. 118–142.
72. Oliveira LS, Souza SL & Manhães CR. **Behavioral satiety sequence: an experimental model for studying feeding behavior.** *Revista de Nutrição*, 24(2011), 619–628.
73. Cooper SJ, Turkish S. **Effects of naltrexone on food preference and concurrent behavioral responses in food-deprived rats.** *Pharmacol. Biochem. Behav*, 33 (1989), pp. 17–20.
74. **Contrave (naltrexone HCl/bupropion HCl) prescribing information.** Deerfield, Illinois: Takeda Pharmaceuticals America Inc., (2014).
75. Bernardes D, Manzoni MSJ, Souza CP, Tenório N, Dâmaso AR. **Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao**

- exercício em ratos.** Rev. bras. Educ. Fís. Esp, 18 (2004), pp. 191-200.
76. Smith SR, Fujioka K, Gupta AK, et al. **Combination therapy with naltrexone and bupropion for obesity reduces total and visceral adiposity.** Diabetes Obes Metab, 15 (2013), pp. 863–866.
 77. Chaston TB, Dixon JB. **Factors associated with percent change in visceral versus subcutaneous abdominal fat during weight loss: findings from a systematic review.** Int J Obes (Lond), 32 (2008), pp. 619–628.
 78. Katsoulis K, Blaudeau TE, Roy JP, Hunter GR. **Diet-induced changes in intra-abdominal adipose tissue and CVD risk in American women.** Obesity (Silver Spring), 17 (2009), pp. 2169–2175.
 79. Ross R, Dagnone D, Jones PJ et al. **Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. A randomized, controlled trial.** Ann Intern Med, 133 (2000), pp. 92 – 103.
 80. Greenway FL, Fujioka K, Plodkowski RA et al. **Effect of naltrexone plus bupropion on weight loss in overweight and obese adults (COR-1): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial.** Lancet, 376 (2010), pp. 595–605.
 81. Berridge KC. **The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience,** Psychopharmacology (Berl), 191 (2007), pp. 391–431.
 82. Olszewski PK, Shaw TJ, Grace MK, et al., **Complexity of neural mechanisms underlying overconsumption of sugar in scheduled feeding: involvement of opioids, orexin, oxytocin and NPY,** Peptides, 30 (2009), pp. 226–33.
 83. Levine AS, Billington CJ. **Opioids as agents of reward-related feeding: a consideration of the evidence,** Physiol Behav, 82 (2004), pp. 57–61.
 84. Cone RD, Cowley MA, Butler AA, et al. **The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis.** Int J Obes Relat Metab Disord, 25 (2001), pp. 63-67.
 85. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, et al. **Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus.** Nature, 411 (2001), pp. 480-484.
 86. Dhillon S, Yang LP, Curran MP. **Bupropion: a review of its use in the management of major depressive disorder.** Drugs, 68 (2008), pp. 653-689.
 87. Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. **The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating.** Neuron, 36 (2002), pp.199-211.
 88. Anderson JW, Greenway FL, Fujioka K, et al. **Bupropion SR enhances weight loss: a 48-week double-blind, placebo-controlled trial.** Obes Res, 10 (2002), pp. 633-641.
 89. Jain AK, Kaplan RA, Gadde KM, et al. **Bupropion SR vs. placebo for weight loss in obese**

- patients with depressive symptoms.** *Obes Res*, 10 (2002), pp. 1049-1056.
90. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. **Central nervous system control of food intake and body weight.** *Nature*, 443 (2006), pp. 289-295.
 91. Halseth A, Shan K, Walsh B, Gilder K, Fujioka K. **Method-of-use study of naltrexone sustained release (SR)/bupropion SR on body weight in individuals with obesity.** *Obesity (Silver Spring, Md)*, 25 (2017), pp. 338-345.
 92. Davis JF, Tracy AL, Schurdak JD, Tschoöp MH, et al. **Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat.** *Behav Neurosci*, 122 (2008), pp. 1257-63.
 93. Alsiö J, Olszewski PK, Norbäck AH, Gunnarsson ZE, Levine AS, et al. **Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus *accumbens* upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats.** *Neuroscience*, 171 (2010), pp. 779–787.
 94. Li Y, South T, Han M, Chen J, Wang R. and Huang XF. **High-fat diet decreases tyrosine hydroxylase mRNA expression irrespective of obesity susceptibility in mice.** *Brain Res*, 1268 (2009), pp. 181–189.
 95. Beaulieu JM; Gainetdinov RR. **The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors.** *Pharmacological Reviews*, 63 (2011), pp. 182-217.
 96. Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, et al. **Brain dopamine and obesity.** *Lancet*, 357 (2001), pp. 1883.
 97. Stice E, Spoor S, Bohon C, Small DM. **Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele.** *Science*, 322 (2008), pp. 449–452.
 98. Haltia LT, Rinne JO, Merisaari H, Maguire RP, et al. **Effects of intravenous glucose on dopaminergic function in the human brain in vivo.** *Synapse*, 61 (2007), pp. 748 –756.
 99. Haltia LT, Rinne JO, Helin S, Parkkola R, Nagren K, Kaasinen V. **Effects of intravenous placebo with glucose expectation on human basal ganglia dopaminergic function.** *Synapse*, 62 (2008), pp. 682– 688.
 100. Steele KE, Prokopowicz GP, Schweitzer MA, Magunson TH, Lidor AO, et al, **Alterations of central dopamine receptors before and after gastric bypass surgery.** *Obes Surg*, 20 (2010), pp. 369 –374.

FIGURAS

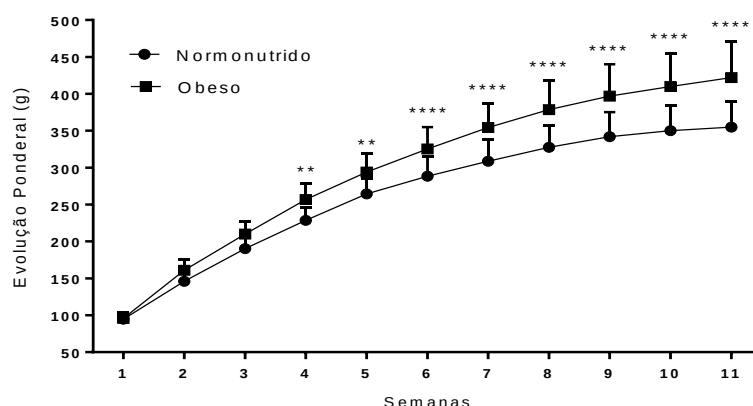


Figura 1. Evolução do peso corporal durante 11 semanas antes do início do tratamento pela associação de naltrexona + bupropiona (1mg+20mg) em 20 animais do grupo normonutrido submetidos a dieta padrão (Presence®) e em 20 animais do grupo obeso submetidos a dieta de cafeteria (Palatável). Valores das medidas no peso corporal são apresentados como gramas e expressos como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças no peso corporal entre o grupo normonutrido e grupo obeso não são estatisticamente significativas na 1ª, 2ª e 3ª semanas após início da ingestão das dietas experimentais. As diferenças são estatisticamente significativas com $**P < 0,005$ na 4ª e 5ª semana, e $****p < 0,0001$ nas semanas subsequentes até a 11ª semana antes do início do tratamento. (two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste $p < 0,05$). g = grama. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

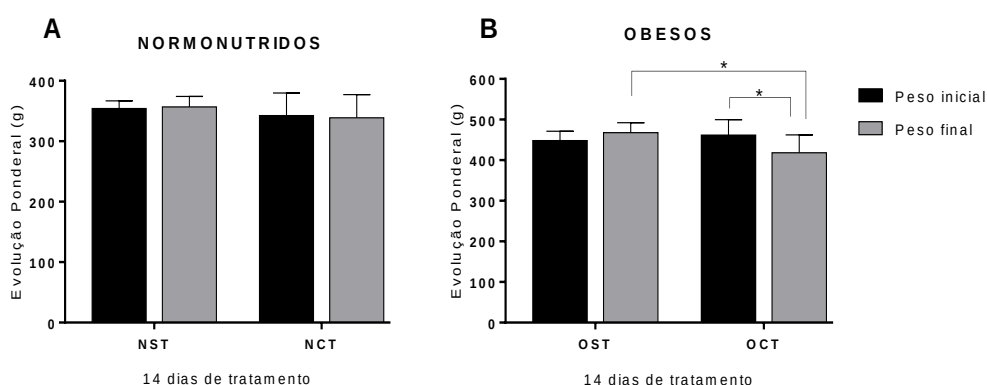


Figura 2. Efeito da combinação de NAL/BUP sobre o peso corporal (inicial e final) em ratos wistar normonutridos e obesos. Os animais foram tratados com NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) ou água destilada (1ml/kg). Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta padrão (Presence®) e os grupos obesos submetidos a dieta de cafeteria. Valores apresentados em gramas e expressos como média $\pm$ desvio padrão do peso corporal dos animais experimentais. **(A)** Não houve diferença significativa entre o peso inicial e peso final nos grupos experimentais. **(B)** As diferenças no peso final de OST são estatisticamente significativas com $*p < 0,05$ em relação ao peso final do grupo OCT. Houve diferença estatisticamente significativa com $*p < 0,05$, entre o peso inicial e final dos animais do grupo OCT. Two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância $*p < 0,05$. NST (normonutrido não tratado) $n=10$, NCT (normonutrido tratado) $n=10$, OST (obeso não tratado) $n=10$ e OCT (obeso tratado) $n=10$. g = grama. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

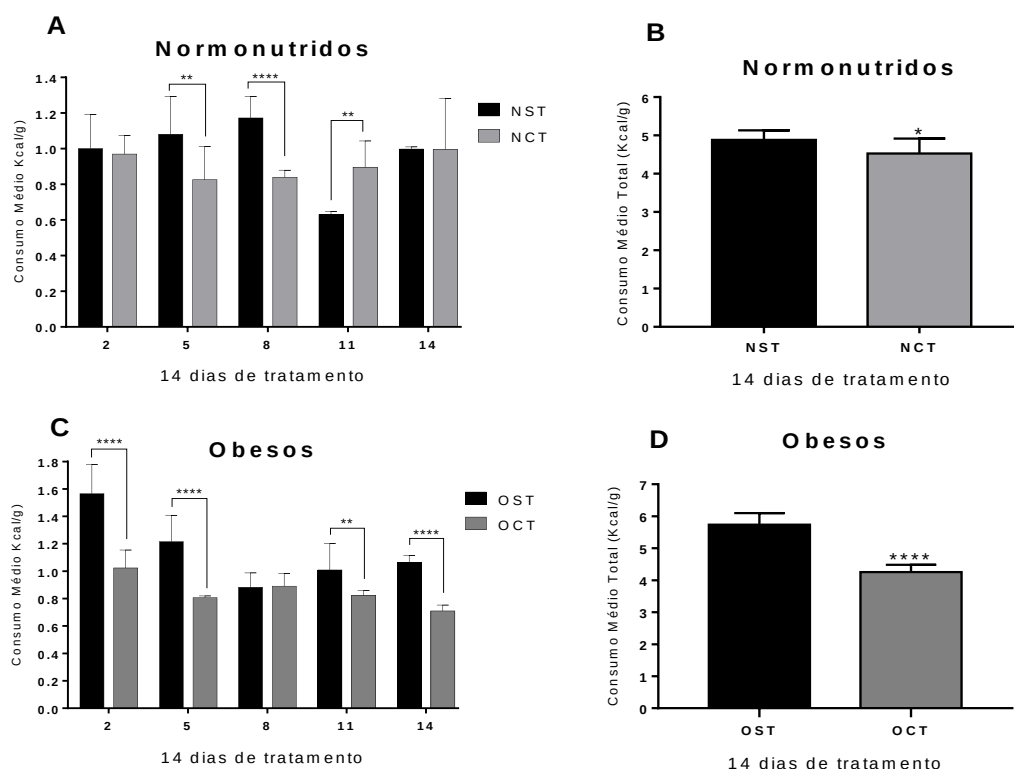


Figura 3. Efeito da combinação de NAL/BUP sobre o consumo alimentar (kcal/g) em ratos wistar machos normonutridos e obesos. Os animais foram tratados com NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) ou água destilada (1ml/kg). O grupo normonutrido foi submetido a dieta padrão e o grupo obeso submetido a dieta de cafeteria. Valores do consumo são apresentados como Kcal/g e expressos como média $\pm$ desvio padrão. **(A)** - As diferenças no consumo de calorias entre normonutridos não tratados e normonutridos tratados são estatisticamente significativas com $**p < 0,01$ no 6° e 11° dia e com $****p < 0,0001$ no 8° dia de tratamento. **(B)** - O As diferenças do consumo médio total de Kcal calorias entre normonutridos não tratados e normonutridos tratados são estatisticamente significativas com $*p < 0,05$. **(C)** - As diferenças no consumo de calorias entre obesos não tratados e obesos tratados são estatisticamente significativas com $****p < 0,0001$ no 2°, 6° e 14° dias de tratamento e com $**p < 0,01$ no 11° dia de tratamento. **(D)** - As diferenças do consumo médio total de kcal entre obesos não tratados e obesos tratados são estatisticamente significativas com $****p < 0,0001$. Two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste (A e C) e Test t *Student* para comparação entre grupos (B e D). Valor de significância $p < 0.05$. NST (normonutrido não tratado) $n=10$, NCT (normonutrido tratado) $n=10$, OST (obeso não tratado) $n=10$ e OCT (obeso tratado) $n=10$. g = grama. Kcal = Kilocalorias. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

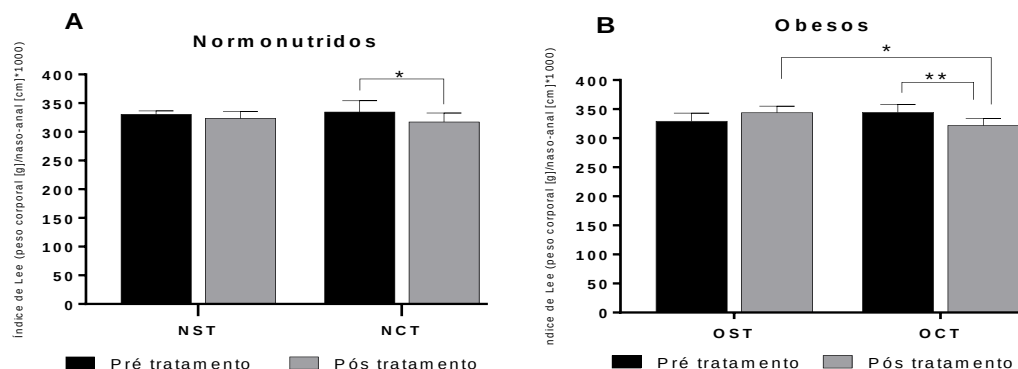


Figura 4. Efeito da combinação de NAL/BUP sobre o índice de Lee antes e após tratamento em ratos wistar normonutridos e obesos. Os animais foram tratados com NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) ou água destilada (1ml/kg). Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta padrão e os grupos obesos submetidos a dieta de cafeteria. Valores do índice de Lee expressos como média $\pm$ desvio padrão. **(A)** - Houve diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas antes do tratamento e após o tratamento no grupo NCT (* $p < 0.05$). **(B)** - Diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas antes do tratamento e após o tratamento no grupo OCT (** $p < 0.01$). Houve diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas após o tratamento entre os grupos OST e OCT (* $p < 0.05$) (two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância $p < 0.05$). NST (normonutrido não tratado) $n=8$, NCT (normonutrido tratado) $n=8$, OST (obeso não tratado) $n=8$ e OCT (obeso tratado) $n=8$. Índice de Lee = $(3\sqrt{\text{peso corporal [g]}/\text{nasoanal [cm]}}) \times 1000$. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

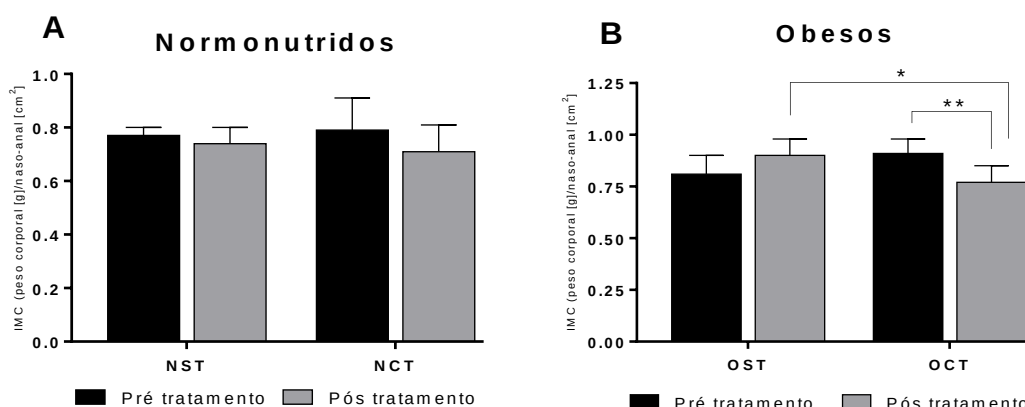


Figura 5. Efeito da combinação de NAL/BUP sobre o índice de Massa Corporal (IMC) antes e após tratamento em ratos wistar normonutridos e obesos. Os animais foram tratados com NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) ou água destilada (1ml/kg). Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta padrão e os grupos obesos submetidos a dieta de cafeteria. Valores do IMC expressos como média $\pm$ desvio padrão. **(A)** - Não houve diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas antes do tratamento e após o tratamento nos grupos NST e NCT. **(B)** - Diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas antes do tratamento e após o tratamento no grupo OCT, ** $p < 0.01$. Houve diferença estatisticamente significativa nas medidas verificadas após o tratamento entre os grupos OST e OCT, * $p < 0.05$. Two-way ANOVA seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância $p < 0.05$. NST (normonutrido não tratado) $n=8$, NCT (normonutrido tratado) $n=8$, OST (obeso não tratado) $n=8$ e OCT (obeso tratado) $n=8$. Índice de Massa Corporal = $\text{peso corporal (g)} / \text{o quadrado do comprimento nasoanal (cm}^2\text{)}$. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

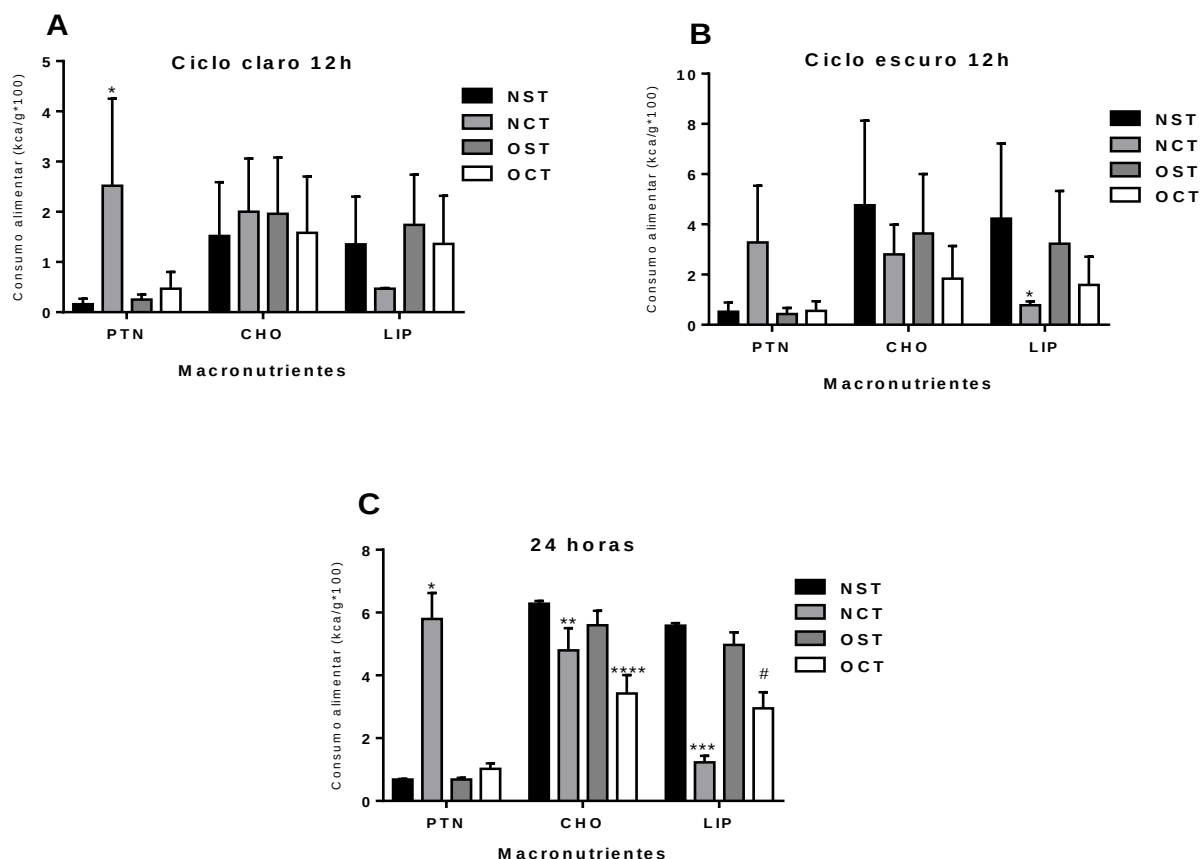


Figura 6. Efeito da combinação de NAL/BUP sobre a preferência por proteínas, carboidratos ou lipídeos em ratos *wistar* machos normonutridos e obesos. Os animais foram tratados com NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) ou água destilada (1ml/kg) e expostos a dieta padrão, dieta de cafeteria e cookie de chocolate. Os valores do consumo foram medidos a cada 12 horas do ciclo claro/escuro e são apresentados em gramas e expressos como média $\pm$ desvio padrão. **(A)** – No grupo NCT houve aumento significativo da preferência a proteínas em comparação ao grupo NST durante o ciclo claro $^{**}p < 0,01$. **(B)** – No grupo NCT houve redução significativa da preferência a lipídeos em comparação ao grupo NST durante o ciclo escuro $^{*}p < 0,05$. **(A e B)** – Não houve diferenças significativas na preferência a carboidratos durante os ciclos claro ou escuro entre os grupos experimentais. **(C)** – No grupo NCT houve aumento significativo da preferência a proteínas em comparação ao grupo NST $^{*}p < 0,0001$. No grupo NCT houve redução significativa da preferência a carboidratos em comparação ao grupo NST $^{**}p < 0,0001$. No grupo OCT houve redução significativa da preferência a carboidratos em comparação a OST $^{****}p < 0,0001$. No grupo NCT houve redução significativa da preferência a lipídeos em comparação ao grupo NST $^{***}p < 0,0001$. No grupo OCT houve redução significativa da preferência a lipídeos em comparação ao grupo OST $^{#}p < 0,0001$. Two-way ANOVA seguido por Tukey pós-teste com valor de significância $p < 0.05$. g = grama. NST = normonutrido não tratado, NCT= normonutrido tratado, OST= obeso não tratado, OCT= obeso tratado, PTN = proteína, CHO = carboidratos, LIP = lipídeos. (n= 5 por subgrupo). Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

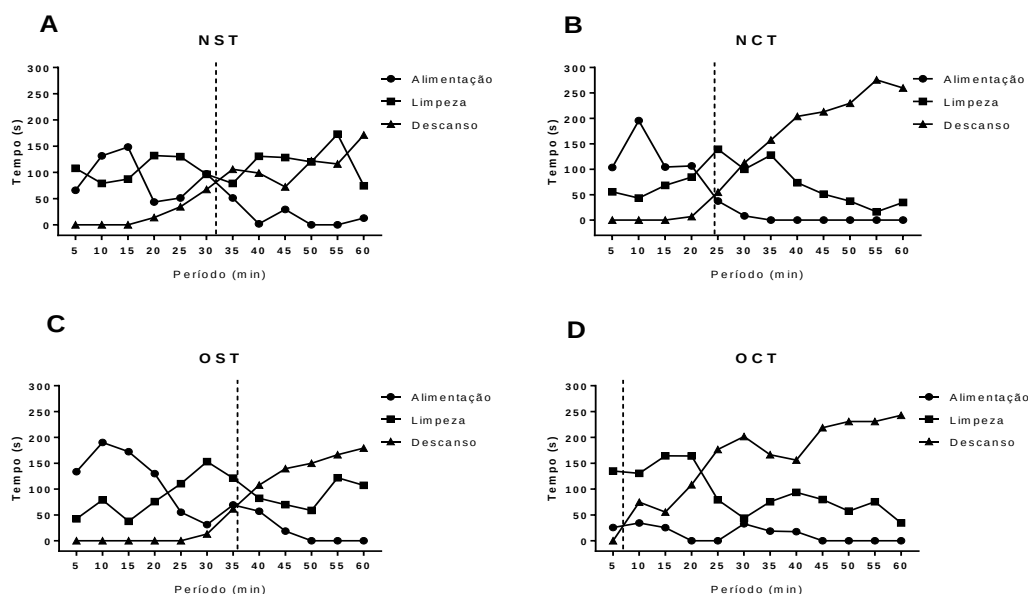


Figura 7. Efeito da combinação de NAL/BUP sobre a Sequência Comportamental da Saciedade em ratos *wistar* machos normonutridos e obesos. Os animais foram tratados com NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) ou água destilada (1ml/kg). Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta padrão e os grupos obesos submetidos a dieta de cafeteria. 5 dias após início do tratamento, os animais foram submetidos a 4 horas de jejum e em seguida foram expostos a dieta por 1 hora, sendo avaliados o comportamento alimentar, limpeza e descanso. Em A, B, C e B, os períodos 5-60 correspondem aos intervalos de 5 min de tempo que compõem uma sessão de teste de 60 min, onde os gráficos ilustram o ponto de transição de alimentação ao descanso através da linha tracejada. No grupo NCT (B), essa linha é deslocada para a esquerda em relação ao NST (A), indicando aparecimento da saciedade mais rapidamente no grupo normonutrido que foi tratado com NAL/BUP. No grupo OCT (D), essa linha é deslocada para esquerda em relação ao grupo OST (C), indicando aparecimento mais precocemente da saciedade em animais obesos tratados com a associação NAL/BUP em relação a animais obesos não tratados. NST (normonutrido não tratado) n=8, NCT (normonutrido tratado) n=8, OST (obeso não tratado) n=8 e OCT (obeso tratado). n=8. Two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Tukey pós-teste com valor de significância $p < 0,05$. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

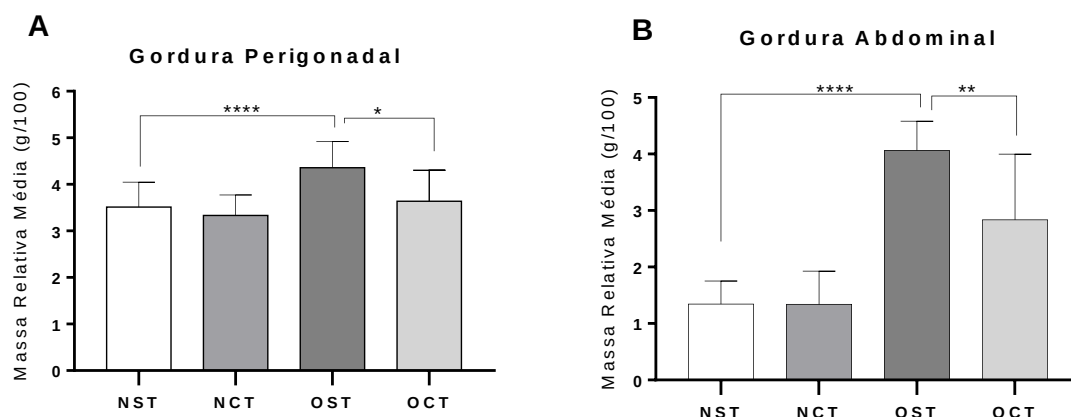


Figura 8. Efeito da combinação de NAL/BUP sobre a massa relativa da Gordura perigonadal (A) e Gordura abdominal (B) em ratos *wistar* machos normonutridos e obesos. Os animais foram tratados com associação de NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) ou água destilada (1ml/kg). Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta padrão e os grupos obesos submetidos a dieta de cafeteria. Valores apresentados como (g/100g) e expressos como média $\pm$ desvio padrão do peso relativo da gordura perigonadal e da gordura abdominal. (A) - As diferenças são estatisticamente significativas nas medidas da massa relativa da gordura perigonadal entre os grupos NST/OST **** $p < 0,0001$ e OST/OCT * $p < 0,05$. (B) - As diferenças são estatisticamente significativas nas medidas da massa relativa da Gordura abdominal entre os grupos NST/OST **** $p < 0,0001$ e OST/OCT ** $p < 0,01$. Todos os pesos obtidos foram utilizados no cálculo do peso relativo de cada órgão, pela fórmula: peso relativo do órgão = (peso do órgão/peso vivo) $\times$ 100. NST (normonutrido não tratado) n=10, NCT (normonutrido tratado) n=10, OST (obeso não tratado) n=10 e OCT (obeso tratado). n=10. Two-way ANOVA seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância $p < 0,05$. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

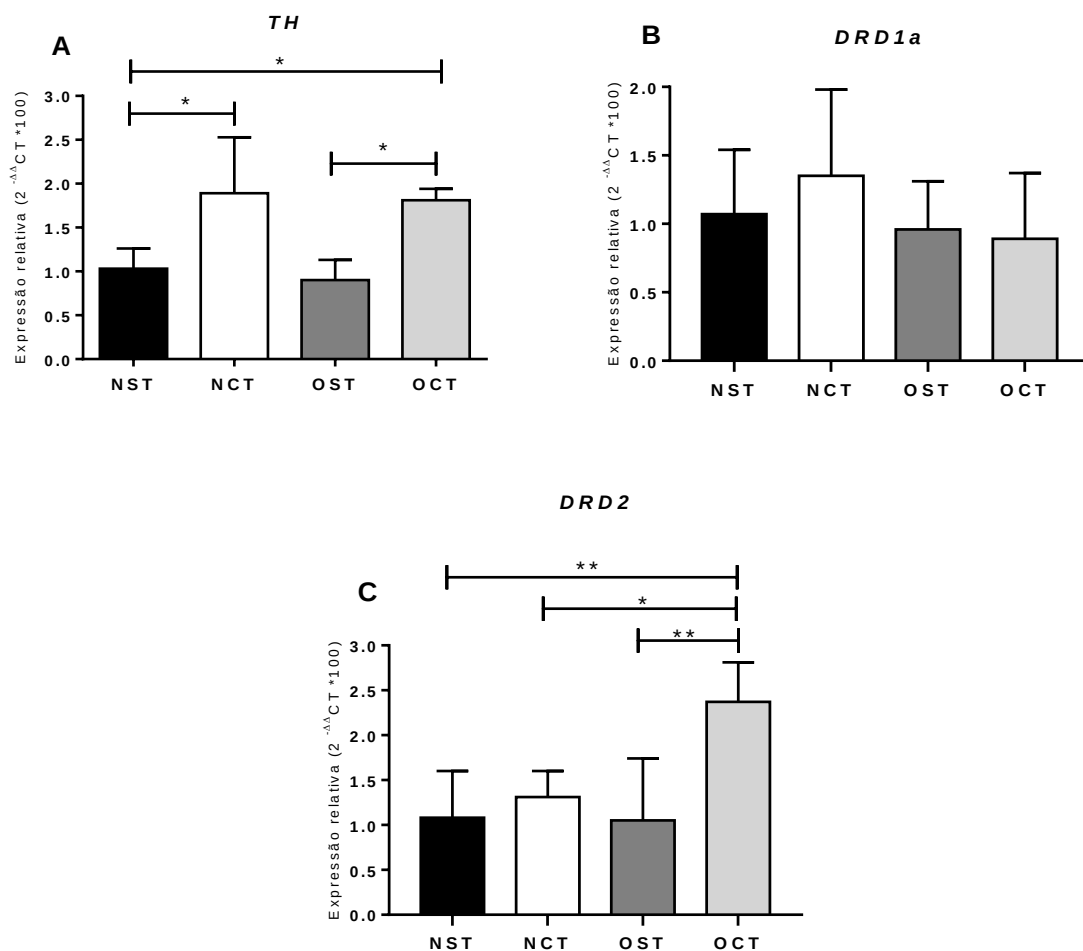


Figura 9. Análise da expressão gênica da tirosina hidroxilase (TH), DRD1a e DRD2 em relação a β -actina no núcleo *accumbens* e estriado de ratos wistar machos normonutridos e obesos. Os animais foram submetidos a dieta padrão e dieta de cafeteria respectivamente. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão. Houve aumento significativo de TH no Nac e estriado de NCT ($1,89 \pm 0,64$) em relação a NST ($1,03 \pm 0,23$) * $p < 0,05$ [Fig. 9A] e de OCT ($1,81 \pm 0,13$) em relação a OST ($0,90 \pm 0,23$) * $p < 0,05$ [Fig. 9A]. Não houve diferenças de OCT ($1,81 \pm 0,13$) em relação a NCT ($1,89 \pm 0,64$) $p > 0,05$ [Fig. 9A]. Não houve diferença significativa na expressão relativa de DRD1a de NST ($1,07 \pm 0,47$) em relação a NCT ($1,35 \pm 0,63$) [Fig. 9B] nem de NCT ($1,35 \pm 0,63$) em relação a OCT ($0,89 \pm 0,48$) [Fig. 9B]; nem entre OST ($0,96 \pm 0,35$) em relação a OCT ($0,89 \pm 0,48$) [Fig. 9B]. Houve aumento significativo na expressão de DRD2 no Nac e estriado de OCT ($2,37 \pm 0,44$) em relação a NCT ($1,31 \pm 0,29$) * $p < 0,05$ [Fig. 9C] e de OCT ($2,37 \pm 0,44$) em relação a OST ($1,05 \pm 0,69$) ** $p < 0,01$ [Fig. 9C] e de OCT ($2,37 \pm 0,44$) em relação a NST ($1,08 \pm 0,52$) ** $p < 0,01$. Não houve diferença significativa na expressão relativa de DRD2 de NST ($1,08 \pm 0,52$) em relação a NCT ($1,31 \pm 0,29$) $p > 0,05$ [Fig. 9C]. TH (n=17), DRD1a (n=18), DRD2 (n=18). NST (normonutrido não tratado), NCT (normonutrido tratado), OST (obeso não tratado) e OCT (obeso tratado). Valores dos níveis da expressão relativa expressos como ($2^{-\Delta\Delta CT} * 100$). One way ANOVA seguido por Tukey pós-teste com valor de significância $p < 0,05$. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta padrão e dieta de cafeteria oferecida aos animais experimentais.

Macronutrientes	Cookie de chocolate	Dieta padrão	Dieta de cafeteria	
			Crescimento	Manutenção
	(%/kcal)	(%/kcal)	(%/kcal)	(%/kcal)
Proteínas	5,6	29,0	18,00	14,00
Carboidratos	50,4	62,0	44,00	47,00
Lipídios	44,0	9,0	38,0	39,0
Fibras	0,0	0,0	0,0	0,0
VET (kcal/g)	5,06	3,30	4,03	4,06

As informações da composição centesimal do Cookie de chocolate Bauducco® foram obtidas no rótulo do produto fornecido pela empresa Pandurata alimentos S/A. 2018, as informações da dieta padrão foram obtidas no rótulo do produto fornecido pela empresa Evalis Presence®, 2018 e da dieta de cafeteria foram obtidas através de análises realizadas no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos/Universidade Federal de Pernambuco (LEAAL/UFPE) e os ingredientes fornecidos pelo fabricante Rhooster indústria e Comércio 2018.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) para os genes da enzima Tirosina hidroxilase (TH), dos receptores DRD_{1a} e DRD₂ e da β -Actina.

Genes	Sequências dos primers
TH	F: 5' – GGC TTC TCT GAC CAG GTG TAT CG-3' R: 5' – GCA ATC TCT TCC GCT GTG TAT TCC – 3'
DRD_{1a}	F: 5' – CTC TGT CTG TCC TTA TAT CCT TCA TCC – 3' R: 5' – AGT TGT CAT CCT CGG TGT CCT – 3'
DRD₂	F: 5' – CAA CAA TAC AGG CAA ACC AGA ATG AG -3' R: 5' – ACC AGC AGA GTG ACG ATG AAG G – 3'
β-Actina	F: 5' – ACG GTC AGG TCA TCA CTA TCG – 3' R: 5' – CAG CAC TGT GTT GGC ATA GAG – 3'

Os primers foram sintetizados e purificados pela empresa IDT – Integrated DNA Technologies (EUA)

Tabela 3. Efeito do uso combinado de NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) sobre os parâmetros avaliados na Sequência Comportamental de Siedade.

Parâmetros	NST	NCT	OST	OCT
Ingestão da dieta (g)	3,63 ± 1,85	3,50 ± 0,93	3,25 ± 1,67	**0.60 ± 0,88
Duração da refeição (s)	633,88 ± 322,34	555,75 ± 165,56	851,00 ± 425,60	***154,13 ± 187,63
Duração de limpeza (s)	1138,25 ± 632,73	831,25 ± 515,02	1060,25 ± 714,97	1133,71 ± 639,02
Duração do descanso (s)	802,50 ± 901,51	1513,63 ± 716,59	818,25 ± 799,78	*1862,38 ± 589,63
Taxa local de alimentação (mg/s)	5,90 ± 0,71	6,45 ± 1,05	4,51 ± 3,60	3,42 ± 1,70
Taxa global de alimentação (g/min)	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,02 ± 0,02

Valores da ingestão alimentar apresentados como gramas (g); duração da alimentação, limpeza e descanso em segundos (s); taxa local como miligramas por segundo (mg/s) e taxa global como gramas por minuto (g/min) e expressos como média ± desvio padrão. n=8 normonutridos sem tratamento (NST), n=8 normonutridos com tratamento (NCT), n=8 obesos sem tratamento (OST) e n=8 obesos com tratamento (OCT). (**p <0.01) (**p <0.001) (*p <0.05). Two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Tukey pós-teste. Valor de significância p <0.05. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

7 RESULTADOS SUPLEMENTARES

Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre a glicemia capilar

O uso combinado de NAL/BUP durante 14 dias de tratamento, reduziu significativamente os valores glicêmicos nos animais normonutridos – NCT ($82,00 \pm 6,14$) em comparação aos valores glicêmicos verificado antes do tratamento - NCT ($92,63 \pm 6,30$). As diferenças são estatisticamente significativas com $p < 0.05$). Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores glicêmicos verificados antes do tratamento e após o tratamento nos grupos normonutrido sem tratamento - NST ($85,25 \pm 14,17$) vs ($85,38 \pm 6,59$) (Fig. 10A). Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores glicêmicos verificados antes do tratamento e após o tratamento nos grupos obeso sem tratamento – OST e obeso com tratamento – OCT. Fig. 10B).

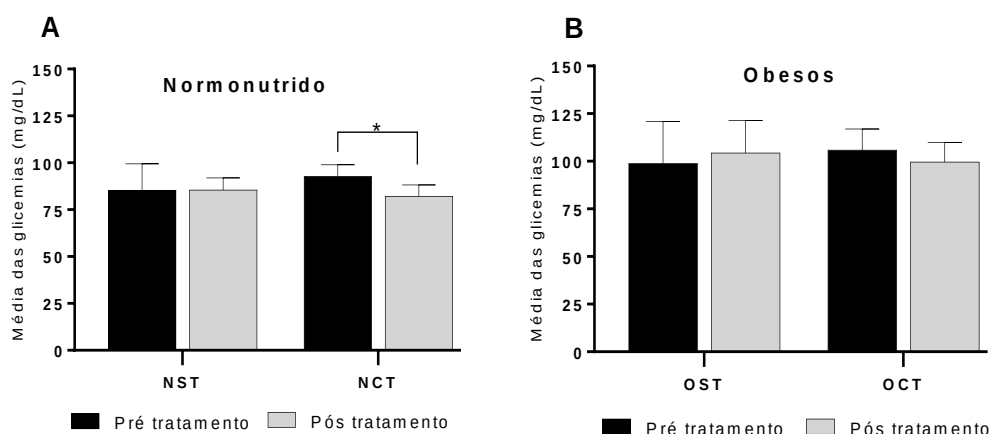


Figura 10. Efeito da combinação de NAL/BUP sobre a glicemia capilar em ratos wistar machos normonutridos e obesos. Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta padrão e os grupos obesos submetidos a dieta de cafeteria. **(A)** - As diferenças nos valores das glicemias no pré e pós tratamento, são estatisticamente significativas no grupo NCT com $*P < 0.05$). Não houve diferença estatisticamente significativa no pré e pós tratamento no grupo NST. **(B)** – Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o pré tratamento e o pós tratamento nas glicemias verificadas nos grupos OST e OCT.. Valores apresentados como (mg/dL) e expressos como média $\pm$ desvio padrão. Two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância $p < 0.05$. NST (normonutrido não tratado) $n=8$, NCT (normonutrido tratado) $n=8$, OST (obeso não tratado) $n=8$ e OCT (obeso tratado) $n=8$. mg/dL = Miligrama por decilitro. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre a massa relativa do fígado e rins

Os animais do grupo OCT ($3,76 \pm 0,84$) apresentaram as medidas de massa relativa de fígado maiores em comparação aos animais OST ($3,51 \pm 0,53$). As diferenças são estatisticamente significativas com $p < 0,0108$ [Fig. 11A].

Não houve diferença nas as medidas de massa relativa de fígado e dos rins entre animais normonutridos ($p > 0,05$). [Figs. 11A-B]. Não houve diferença nas as medidas de massa relativa dos rins entre animais Obesos ($p > 0,05$) [Fig. 11B].

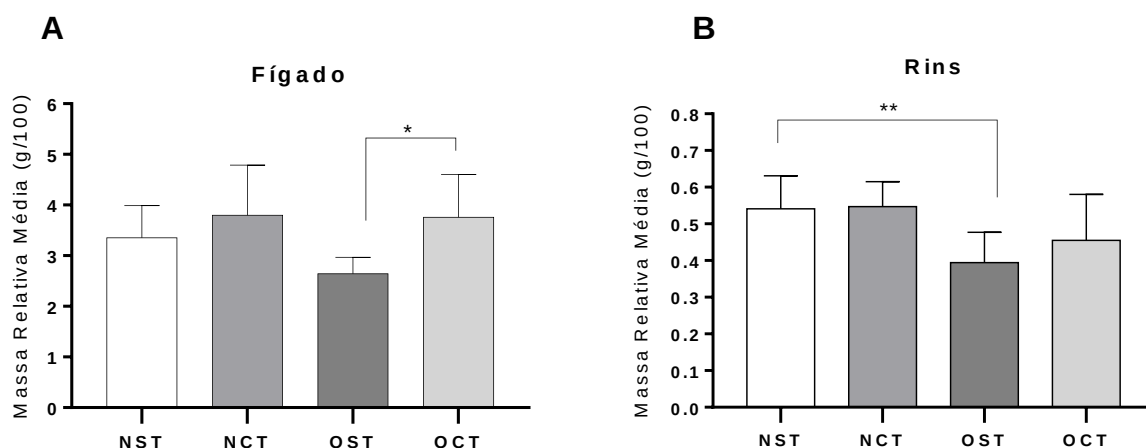


Figura 11. Efeito da combinação de NAL/BUP sobre a massa relativa do Fígado (A), Rins (B), de em ratos wistar machos normonutridos e obesos. Os animais foram tratados com associação de Naltrexona + Bupropiona NAL/BUP (1mg+20mg) ou água destilada (1ml/kg). Os grupos normonutridos foram submetidos a dieta padrão (Presence®) e os grupos obesos submetidos a dieta ocidentalizada (Palatável). Valores apresentados como (g/100g) e expressos como média $\pm$ desvio padrão do peso relativo do Fígado e Rim. **(A)** - As diferenças são estatisticamente significativas nas medidas da massa relativa do fígado entre os grupos OCT e OST (* $P < 0,01$). **(B)** - As diferenças são estatisticamente significativas nas medidas da massa relativa do Rins entre os grupos NST e OST (** $P < 0,01$). Todos os pesos obtidos foram utilizados no cálculo do peso relativo de cada órgão, pela fórmula: peso relativo do órgão = (peso do órgão/peso vivo) $\times$ 100. NST (normonutrido não tratado) $n=10$, NCT (normonutrido tratado) $n=10$, OST (obeso não tratado) $n=10$ e OCT (obeso tratado) $n=10$. Two-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância $p < 0.05$. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre o perfil bioquímico

Os animais do grupo OCT apresentaram as medidas de **Fosfatase alcalina** maiores em comparação aos animais OST ($303,09 \pm 0,39$) vs ($213 \pm 27,10$) $p < 0,0001$. Não houve diferença nas medidas de **Fosfatase alcalina** entre animais normonutridos [tratado] vs [não tratado], nem entre animais normonutridos [não tratado] vs obesos [não tratado] ($p > 0,05$).

Os animais do grupo NCT apresentaram as medidas de **AST** maiores em comparação aos animais NST ($228,27 \pm 17,92$) vs ($159,05 \pm 8,49$) $p < 0,0001$. Não houve diferença nas medidas de **AST** entre animais obesos [não tratado] vs normonutridos [não tratado], nem entre animais obesos [tratado vs não tratado] ($p > 0,05$). [Tabela 5].

Tabela 5. Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre o perfil bioquímico.

Parâmetros	NST	NCT	OST	OCT	P valor
Lipase (mg dL ⁻¹)	13,46 ± 0,17	19,52 ± 3,43	15,06 ± 1,07	14,69 ± 0,39	p>0.05
Fosfatase alcalina (U mL ⁻¹)	220,03 ± 23,55	237,19 ± 43,17	213,00 ± 27,10	[#] 303,09 ± 45,19	p< 0.05[#]
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0,26 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,21 ± 0,03	p>0.05
Ureia (mg dL ⁻¹)	41,37 ± 2,19	39,72 ± 2,31	30,64 ± 1,87	32,04 ± 2,83	p>0.05
Ácido úrico (mg dL ⁻¹)	1,09 ± 0,12	1,39 ± 0,17	1,05 ± 0,09	1,38 ± 0,24	p>0.05
AST (U mL ⁻¹)	159,05 ± 8,49	^{**} 228,27 ± 17,92	157,87 ± 10,05	196,62 ± 19,76	p>0.05^{**}
ALT (U mL ⁻¹)	57,43 ± 3,02	68,60 ± 8,49	47,55 ± 4,02	60,93 ± 6,85	p< 0.05
Albumina (mg dL ⁻¹)	2,46 ± 0,05	2,42 ± 0,06	2,46 ± 0,05	2,52 ± 0,06	p>0.05
Glicose (mg dL ⁻¹)	135,55 ± 6,22	122,87 ± 7,92	[*] 198,07 ± 12,16	^a 143,10 ± 7,81	p< 0.05^{a*}
Proteínas totais (U mL ⁻¹)	7,05 ± 0,11	6,93 ± 0,14	7,22 ± 0,11	7,20 ± 0,10	p>0.05
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	53,66 ± 5,53	46,72 ± 4,64	50,82 ± 7,52	54,41 ± 6,44	p>0.05
CT (mg dL ⁻¹)	57,09 ± 10,51	74,47 ± 4,10	71,70 ± 3,82	88,10 ± 3,61	p>0.05
HDL (mg dL ⁻¹)	50,52 ± 2,20	61,18 ± 2,59	57,32 ± 3,10	70,87 ± 3,08	p>0.05
Gama GT (mg dL ⁻¹)	0,99 ± 0,66	0,16 ± 0,16	0,85 ± 0,45	0,87 ± 0,67	p>0.05

Normonutrido sem tratamento – NST (n= 10) e normonutrido com tratamento – NST (n= 10), e obeso sem tratamento – OST (n= 10) e obeso com tratamento – OST (n= 10), que foram tratados com associação de Naltrexona + Bupropiona NAL/BUP (1mg+20mg) ou água destilada (1ml/kg). Os animais foram submetidos a dieta padrão de biotério (normonutridos) ou dieta ocidentalizada (obesos). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Ttwo-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância p <0.05. Analisador automatizado de Bioquímica clínica CMD 800iX1 (Wiener Lab Group). Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

Os animais do grupo OCT apresentaram as medidas de **Glicose** menores comparação aos animais OST (143,10 ± 7,81) vs (198,07 ± 12,16) p <0,01, enquanto o grupo OST apresentou as medidas de **Glicose** maiores quando comparado ao grupo NST (198,07 ± 12,16) vs (135,55 ± 6,22) respectivamente p <0,001. Não houve diferenças nas medidas de **Glicose** entre animais normonutridos [tratado vs não tratado] (p >0,05). Não houveram diferenças significativas nos outros parâmetros bioquímicos analisados entre os grupos experimentais [Tabela 5].

Com relação aos parâmetros hematológicos, os animais do grupo OCT apresentaram as medidas de **Plaquetas** maiores em comparação aos animais OST (528,40 ± 79,38) vs (405,70 ± 50,59) p <0,0001, e o grupo OST apresentou as medidas de **Plaquetas** maiores quando comparado ao grupo NST (405,70 ± 50,59) vs (310,54 ± 31,98) respectivamente p <0,0001. Não houve diferenças nas medidas de **Plaquetas** entre animais normonutridos [tratado] vs [não tratado], nem entre animais normonutridos [não tratado] vs obesos [não tratado] (p >0,05). Não houveram diferenças significativas nos outros parâmetros hematológicos analisados entre os grupos experimentais. Valores expressos como média ± erro padrão da média [Tabela 6].

Tabela 6. Efeito do uso combinado de NAL/BUP sobre o perfil hematológico.

Parâmetros	NST	NCT	OST	OCT	P valor
Leucócitos WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,85 $\pm$ 0,50	3,79 $\pm$ 0,39	5,43 $\pm$ 0,40	5,01 $\pm$ 0,79	p> 0.05
Hemoglobina (g/dL)	14,98 $\pm$ 0,689	14,05 $\pm$ 0,272	13,72 $\pm$ 0,437	14,24 $\pm$ 0,629	p> 0.05
Hematócrito (%)	42,76 $\pm$ 1,879	41,82 $\pm$ 0,897	41,12 $\pm$ 1,249	42,56 $\pm$ 1,710	p> 0.05
VCM (fL)	52,82 $\pm$ 0,505	54,75 $\pm$ 0,653	53,7 $\pm$ 0,671	53,92 $\pm$ 0,474	p> 0.05
HCM (pg)	18,50 $\pm$ 0,363	18,42 $\pm$ 0,321	17,95 $\pm$ 0,431	18,06 $\pm$ 0,346	p> 0.05
CHCM (g/dL)	35,01 $\pm$ 0,524	33,63 $\pm$ 0,406	33,43 $\pm$ 0,523	33,49 $\pm$ 0,646	p> 0.05
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	310,54 $\pm$ 31,981	312,35 $\pm$ 36,636	^a 405,70 $\pm$ 50,594	^{*#} 528,40 $\pm$ 79,381	p< 0.05^{a*#}
Neutrófilos (%)	1,51 $\pm$ 0,198	1,52 $\pm$ 0,245	2,11 $\pm$ 0,368	1,76 $\pm$ 0,235	p> 0.05
Linfócitos (%)	2,13 $\pm$ 0,382	2,07 $\pm$ 0,232	3,07 $\pm$ 0,330	2,84 $\pm$ 0,535	p> 0.05
Monócitos (%)	0,02 $\pm$ 0,008	0,04 $\pm$ 0,020	0,04 $\pm$ 0,011	0,10 $\pm$ 0,071	p> 0.05
Eosinófilos (%)	0,13 $\pm$ 0,047	0,08 $\pm$ 0,027	0,17 $\pm$ 0,043	0,11 $\pm$ 0,031	p> 0.05
Basófilos (%)	0,10 $\pm$ 0,051	0,06 $\pm$ 0,020	0,04 $\pm$ 0,010	0,18 $\pm$ 0,143	p> 0.05
MPV (%)	4,10 $\pm$ 0,229	3,82 $\pm$ 0,056	3,80 $\pm$ 0,067	3,78 $\pm$ 0,047	p> 0.05
RDW (%)	10,44 $\pm$ 0,256	11,49 $\pm$ 0,202	11,45 $\pm$ 0,366	11,98 $\pm$ 0,550	p> 0.05
RBC (%)	8,11 $\pm$ 0,406	7,64 $\pm$ 0,172	7,66 $\pm$ 0,240	7,90 $\pm$ 0,328	p> 0.05

Normonutrido sem tratamento – NST (n= 10) e Normonutrido com tratamento – NST (n= 10), e obeso sem tratamento – OST (n= 10) e obeso com tratamento – OST (n= 10), que foram tratados com associação de Naltrexona + Bupropiona NAL/BUP (1mg+20mg) ou água destilada (1ml/kg). Os animais foram submetidos a dieta padrão de biotério (normonutridos) ou dieta ocidentalizada (obesos). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Ttwo-way ANOVA para medidas repetidas seguido por Bonferroni pós-teste com valor de significância p< 0.05. Analisador automatizado hematológico Sysmex XT- 4000i (Roche®). Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2018.

8 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS SUPLEMENTARES

No nosso estudo, a glicemia foi verificada utilizando dois métodos. A glicemia capilar, que foi realizada em dois momentos: antes e depois do tratamento, com o propósito de verificar alterações nos valores durante esse intervalo de tempo proposto, e os valores glicêmicos que foram verificados durante as análises dos parâmetros bioquímicos.

No que concerne a glicemia de jejum, é bem estabelecida a relação entre o aumento de tecido adiposo ao aumento dos níveis glicêmicos após indução por dieta hiperlipídica (BUETTNER et al, 2006; FRALOUB et al, 2010; BUETTNER et al, 2007; BARNEA et al 2006). Esse aumento da glicemia provavelmente está associado ao aumento da quantidade de gordura corporal e também com aumento de hormônios hiperglicemiantes: glucagon, adrenalina, cortisol e hormônio de crescimento (CARVALHEIRA et al.2002; NERY, 2008).

No nosso estudo, o uso combinado de NAL/BUP, reduziu a glicemia capilar nos animais normonutridos [tratado vs não tratados], enquanto na análise bioquímica, revelou uma redução dos níveis séricos de glicose em animais obesos [tratado vs não tratados]. Esses achados são consistentes com estudos anteriores, que indicam que a NAL/BUP melhoram o perfil glicêmico (HOLLANDER et al, 2013).

No nosso estudo, o uso combinado de NAL/BUP aumentou também as medidas da massa relativa do fígado entre animais obesos [tratado vs não tratados], mas não diferenciou entre animais normonutridos [tratado vs não tratados]. Também não houve alterações nas medidas de massa relativa dos rins tanto em animais normonutridos [tratado vs não tratados], quanto em animais obesos [tratado vs não tratados].

Achados de investigações anteriores sugerem que os sinais de toxicidade sistêmica, também podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (GONZALEZ, 2003).

De fato, em investigações anteriores, Silva et al (2015) e (Almeida et al, 2015) constataram que os animais que foram alimentados com dieta hipercalórica apresentaram um maior peso hepático que o grupo controle.

Segundo Bogliolo (2011), o fígado é o segundo maior órgão do corpo, sendo responsável pelo processamento e armazenamento dos nutrientes absorvidos no trato digestivo. O fígado é um alvo principal de toxicidade, por ser um órgão central no seu metabolismo. Este órgão é vulnerável a uma ampla variedade de agressões metabólicas, tóxicas, microbianas, circulatórias e neoplásicas (ROBINS; COTRAN, 2005; CAMPOS et al. 2009).

Sabe-se que os rins são os órgãos responsáveis pela manutenção do volume e da composição do fluido extracelular de cada indivíduo dentro dos limites fisiológicos compatíveis

com a vida. Eles desempenham suas funções através da filtração glomerular, reabsorção e secreção tubular, levando à excreção das substâncias indesejadas na urina. Além disso, os rins secretam hormônios e exercem importante papel na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico, da osmolaridade e do equilíbrio ácido-base (GUYTON; HALL, 2006; AIRES, 2008).

A composição bioquímica do soro sanguíneo reflete de modo fiel a situação metabólica dos tecidos animais (GONZÁLEZ, 2003). Segundo Bernardes et al, (2004) e Fernandes et al, (2004), os valores séricos de colesterol total e de triacilgliceróis podem aumentar após o recebimento de dietas com alta densidade energética.

Sabe-se que a hipercolesterolemia, nos animais, também pode indicar doença hepática ou biliar, síndrome nefrótica, diabetes mellitus, enquanto a hipocolesterolemia pode estar associada, algumas vezes, à disfunção hepática grave (MOTTA, 2003; KERR, 2003; MATOS; MARTINS 2005).

No nosso estudo, ocorreu aumento modesto tanto de triglicerídeos quanto do colesterol HDL em obesos (tratados vs não tratados) embora sem refletir significância estatística. Estudos anteriores mostraram que a combinação de NAL/BUP ocasionou aumento no colesterol HDL, e diminuiu níveis de triglicerídeos além de ocasionar melhorias sobre a taxa de glicose e insulina (HOLLANDER, 2013; YANOVSKI; YANOVSKI et al, 2015; PAPA, et al, 2016)

Com relação aos parâmetros bioquímicos, nossos achados evidenciaram que o uso combinado de NAL/BUP aumentou as medidas de Fosfatase alcalina (FAL) em animais obesos [tratado vs não tratados], mas não diferenciou entre animais normonutridos [tratado vs não tratados] e aumentou também as medidas de AST e em animais normonutridos [tratado vs não tratados], mas não diferenciou entre animais obesos [tratado vs não tratados], embora tenha havido um aumento em obesos, porém sem importância estatística.

Investigações anteriores indicam que as intoxicações medicamentosas geralmente elevam acentuadamente os níveis das enzimas transaminases. A fosfatase alcalina (FAL) e a ALT são enzimas que se elevam quando há lesão das vias biliares. O fígado produz a bile, que é drenada pelas vias biliares (MOTTA, 2003; KERR, 2003; MATOS; MARTINS 2005; THRALL, 2007). As análises das enzimas transaminases (ALT e AST) e de FAL são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas (MARTIN et al. 1981; BRUNT, 2005). As transaminases estão amplamente distribuídas nos tecidos, a AST predomina no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, a ALT no fígado, rim e coração e a FAL é encontrada em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e nos ossos. A AST está presente no citosol e na mitocôndria dos hepatócitos. A AST e ALT são considerados sensíveis indicadores de dano hepatocelular e dentro dos limites

pode fornecer uma avaliação quantitativa do grau de danos sofridos pelos hepatócitos (MILLER; GONÇALVES, 1999; AL-HABORI et al. 2002). Em relação a FAL, geralmente qualquer hepatopatia ativa pode aumentar os valores de FAL, mas as maiores elevações nos níveis da enzima ocorrem nos casos de obstrução do trato biliar que pode ser induzida por medicamentos. Portanto, essa enzima pode ser um marcador importante da atividade da membrana plasmática e do retículo endoplasmático durante tratamentos farmacológicos como na combinação NAL/BUP e em algumas condições patológicas (MILLER; GONÇALVES, 1999; SUGANAMI et al.,2009; CASTRO et al, 2011). Não houve alterações significativas nos outros parâmetros bioquímicos analisados entre os grupos experimentais.

Com relação aos parâmetros hematológicos, os resultados de nosso estudo mostraram que o uso combinado de NAL/BUP aumentou as medidas de Plaquetas em animais obesos [tratado vs não tratado], não apresentando diferenças entre animais normonutridos [tratado vs não tratado]. Não houve alterações nos outros parâmetros hematológicos analisados entre os grupos experimentais. De acordo com Silva et al (2012), os parâmetros hematológicos são importantes para o estudo de toxicidade medicamentosa, devido ao sistema hematopoiético ser altamente sensível as atividades dos agentes tóxicos, como aqueles com potencial mutagênico ou citotóxico. Esses agentes tóxicos podem resultar em várias alterações, como qualitativas ou quantitativas, transitórios ou permanente e ainda podem limitar a utilização de medicamentos.

O sistema hemostático normal resulta da interação precisa entre componentes das paredes dos vasos, as plaquetas circulantes e proteínas do plasma. A ativação não regulada do sistema hemostático pode causar trombose ou embolismo, reduzindo o fluxo sanguíneo a órgãos críticos como o cérebro ou o miocárdio (HANDIN, 1998).

9 PERSPECTIVAS

O corpo de resultados que compõe esta tese nos instiga a dar continuidade aos estudos sobre os efeitos da combinação NAL/BUP sobre a via dopaminérgica do comportamento alimentar. Tendo em vista ser este o primeiro trabalho realizado neste sentido, se faz necessário investigações mais detalhadas e aprofundadas, buscando um maior entendimento das bases neurobiológicas e comportamentais associadas aos efeitos produzidos por essa associação sobre as vias relacionadas ao consumo hedônico e homeostático. Com base nisto relacionamos abaixo objetivos a serem abordados em estudos futuros envolvendo a temática.

- ✓ Investigar o efeito de NAL/BUP sobre a via de sinalização dopaminérgica, envolvendo um período mais prolongado do consumo da dieta hipercalórica, envolvendo um quantitativo maior de animais, além de um maior tempo para realização do tratamento;
- ✓ Investigar efeito de NAL/BUP sobre o sistema opióides, especialmente sobre os receptores mu-opióides;
- ✓ Investigar o efeito de NAL/BUP sobre perfil imunohistoquímico de neurônios imunorreativos para anti – Th, DRD1a e DRD2 e mu-opióides em áreas relacionadas ao comportamento alimentar;
- ✓ Investigar a toxicidade aguda e crônica da combinação de NAL/BUP sobre o perfil comportamental, histológico, bioquímicos e hematológicos em ratos obesos;
- ✓ Investigar e correlacionar os efeitos da combinação de NAL/BUP sobre outras estruturas relacionadas ao sistema de recompensa;
- ✓ Investigar e correlacionar os efeitos da combinação de NAL/BUP sobre os níveis de dopamina, leptina e grelina em áreas do cérebro relacionadas ao comportamento alimentar.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo dos efeitos da associação naltrexona e bupropiona sobre a via dopaminérgica do comportamento alimentar no núcleo *accumbens* e estriado em ratos wistar obesos demonstrou que as doses combinadas de NAL (1mg/kg) e BUP (20mg/kg) promove em ratos obesos, aumento nos níveis de expressão gênica da enzima tirosina hidroxilase e de receptores DRD₂ no estriado ventral e modifica o comportamento alimentar hedônico, promovendo redução na ingestão calórica, principalmente de alimentos palatáveis, o que ocasiona a perda de peso e de gordura corporal, redução das medidas do IMC e do índice de Lee e antecipação do comportamento de saciedade. Além disso, a combinação de NAL/BUP também promove redução dos valores glicêmicos e aumenta embora discretamente os níveis de colesterol HDL.

REFERÊNCIAS

- AIRES MM. **Fisiologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- AL-HABORI M, AL-AGHBARI A, AL-MAMARY M, BAKER M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **J Ethnopharmacol**. 83(3):209-17. 2002.
- ALMEIDA MEF, SANTOS VS, SIMÃO AA, CORRÊA AD. Dieta de cafeteria com chocolate, amendoim e biscoito: eficácia na indução do excesso de peso e da dislipidemia em ratos. **Rev. Saúde e Biol.**, 10 (3): 15-24. 2015
- ALMEIDA SS, NASCIMENTO PCBD, QUAIOTI TCB. Quantidade e qualidade de produtos alimentícios anunciados na televisão brasileira. **Rev Saúde Pública**. 36:353-5. 2002.
- ANIS AH, ZHANG W, BANSBACK N, GUH DP, AMARSI Z, BIRMINGHAM CL. Obesity and overweight in Canada: an updated cost-of-illness study. **Obes Rev**. Jan; 11(1):31-40. 2010.
- ANJOS LA. Body mass index (body mass/body height-2) as indicator of nutritional status in adults: review of the literature **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 431-436, dez. 1992.
- ARAKI KY, FUJIMURA S, MACDONALD ME. and BHIIDE PG. Characterization of Mouse Striatal Precursor Cell Lines Expressing Functional Dopamine Receptors. **Dev Neurosci**, v.28, n.6, p.518–527. 2006.
- ARIAS-CARRIÓN O, STAMELOU M, MURILLO-RODRIGUEZ E, MANENDEZ GONZALES M, PÖPPEL E. Dopaminergic reward system: a short integrative review. **Int Arch Med**. 3:24. 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. Diretrizes brasileiras de obesidade 2016/**ABESO** – 4.ed. - São Paulo, SP 2016.
- BAHIA L, Araújo DV. O impacto econômico da obesidade no Brasil. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro, 2014;13(1):13-17v.13, n. 1, jan/mar 2014.
- BAHIA L, et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**. Jun 18; 12:440. 2012.
- BAIK JH. Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Frontiers in neural circuits*, v. 7, n. October, p. 152, 2013.

BARBIERI AF. Obesidade na adolescência: aspectos de adesão e permanência em programa de tratamento Multiprofissional pautado na terapia comportamental **Conexões: revista da Faculdade de Educação Física da UNICAMP**, Campinas, v. 9, n. 1, p. 1-23, jan. /abr. 2011.

BARNEA M, SHAMAY A, STARK AH, MADAR Z. A high-fat diet has a tissue-specific effect on adiponectin and related enzyme expression. **Obesity**. 14 (12):2145-53. 2006.

BEAULIEU JM, GAINETDINOV RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. **Pharmacological Reviews**. Mar; 63(1): 182-217. 2011.

BEN-JONATHAN N, HNASKO E R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. **Endocr Rev**, v.22, n.6, Dec, p.724-63. 2001.

BERNARDES, D. et al. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 18, n. 2, p. 191-200, 2004.

BERNARDIS LL, PATTERSON BD. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, n. 4, p. 527-8, 1968.

BERRIDGE KC, KRINGELBACH ML. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. **Psychopharmacology (Berl)** [S.I.] 199 (3):457-80. 2008.

BERTHOUD HR. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. **Obesity (Silver Spring)**, v.14 Suppl 5, Aug, p.197-200. 2006.

BRANCO ACSC, et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Rev Bras Cienc Saúde**. 15(2):209-14. 2011.

BOUCHARD C. Physical activity and obesity. **Human Kinetics**, Champaign, 2000.

BRANDÃO DC, SILVA CARLOS AB. Investigação do perfil antropométrico dos praticantes de Caminhada/corrida. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, São Paulo, v.6, n.36, p.552-559. Nov/Dez. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2017. Disponível em: < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2017.

BRAY GA, POPKIN BM. Dietary fat intake does affect obesity! **Am. J. Clin. Nutr.**, v.68, p.1157-1173, 1998.

BRUNT, E.M. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatol Res.** v.33, n.2, p. 68-71, 2005.

BUETTNER R, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol.** 36:485-501. 2006.

BUETTNER R, SCHOÖLMERICH J, BOLLHEIMER LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity.** 15:798-808. 2007.

BUNZOW JR, et al. Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. **Nature.** 336:783-787. 1988.

CALNE DB. Neurotransmitters, neuromodulators and neurohormones. **Neurology** 29: 1517–1521; 1979.

CAMPOS DF, DABUS DMM, LIMA GS, TRETIN TC, LÉO VF, PEREIRA DM. Hepatotoxicidade dos antifúngicos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.** n.12, 2009.

CARLSSON A, WALDECK A. A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). **Acta Physiol Scand**, v.44, n.3-4, Dec 15, p.293-8. 1958.

CARVALHEIRA JBC, ZECCHIN HG, SAAD MJA. Bases moleculares e fisiológicas da resistência à insulina. **Hipertensão.** 5(1):33-8. 2006.

CASTAÑEDA TR, TONG J, DATTA R, CULLER M, TSCHÖP MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. **Front Neuroendocrinol.** Jan;31(1):44-60. 2010.

CASTRO E SILVA JUNIOR, et al. Laser enhanced effect in hepatic regeneration after partial hepatectomy in rats. **Laser Surg Med** v.28, p.1-5, 2011.

CASTRO H, POMAR CA, PICÓ C, SÁNCHEZ J, PALOU A. Cafeteria diet over feeding in Young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independente of body weight. **Int. J. Obes.**, v. 39, n. 3, p. 430-437, março, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Obesity and overweight.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/obesity/adult/index.html> Acesso em: 25 out. 2017.

CLAPPER JR. et al. Effects of amylin and bupropion/natrexone on food intake and body weight are interactive in rodents models. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 698, p. 292-298, 2013.

COUTINHO WF, CABRAL MDA. Farmacoterapia da obesidade nos consensos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v.44, n.01, p.91-94, fev. 2000.

CURRIE C et al., EDS. Social determinants of health and well-being among young people: **Health Behaviour in School-aged Children (HBSC) study: international report from the 2009/2010 survey**. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2012 Health Policy for Children and Adolescents, n°6
http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0003/163857/Social-determinants-of-health-and-well-being-amongyoung-people.pdf, accessed 25 Out 2017.

CYNTHIA L. et al. **Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2011–2014** NCHS Data Brief No. 219 November 2015.
<https://www.cdc.gov/nchs/data/databriefs/db219.pdf>. accessed 25 Out 2017.

DADALT C. **Efeitos da cirurgia bariátrica no estresse oxidativo**. Florianópolis, SC 2010; 90. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/94059/280961.pdf?sequence=1>>. Acesso em 07 de outubro de 2017.

DAHLSTROM A, FUXE K. Localization of monoamines in the lower brain stem. **Experientia** 20, 398–399; 1964.

DAVIDOWA H, PLAGEMANN A. Different responses of ventromedial hypothalamic neurons to leptin in normal and early postnatally overfed rats. **Neurosci Lett**. 293(1):21-4. 2000.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **The surgeon general's call to action to prevent and decrease overweight and obesity**. [Rockville, MD]: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General, 2001.

DUARTE ACG, FAILLACE GBD, WADI MT, PINHEIRO RL. **Síndrome Metabólica Semiologia, Bioquímica e Prescrição Nutricional**. São Paulo: Axcel Books do Brasil Editora Ltda; 2005.

ENES CC, SLATER B. Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.13, n.1, p.163-171, 2010.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. How palatable food disrupts appetite regulation. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 97:61-73. 2005.

ESTADELLA D, OYAMA LM, DÂMASO AR, RIBEIRO EB, OLLER DO NASCIMENTO CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v.20, n.2, p.218-24, 2004.

ESTEVINHO M.F, FORTUNATO JMS. Dopamina e Receptores. **Revista Portuguesa Psicossomática**, 5:21-31, 2003.

FALLON JH AND MOORE RY. Catecholamine innervation of the basal forebrain IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. **J. Comp. Neurol.**, 180: 545–579. 1978.

FARIA AM, MANCINI MC, MELO MEDE, CERCATO C, HALPERN A. Progressos recentes e novas perspectivas em farmacoterapia da obesidade. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.** 54, 516–529; 2010.

FERNANDES, AAH. et al. Influência da dieta hipercalórica sobre parâmetros bioquímicos séricos, hepáticos e cardíacos em ratos. **Revista Nutrição em Pauta**, v. XII, n. 65, p. 43-50, 2004.

FINKELSTEIN EA, TROGDON JG, COHEN JW, DIETZ W. Annual medical spending attributable to obesity: payer-and service-specific estimates. **Health Aff (Millwood)**. Sep-Oct; 28(5):w822-31. 2009.

FISBERG M, OLIVEIRA CL. Obesidade na infância e adolescência: uma verdadeira epidemia. **Arq Endocrinol Metab**; 47: 107-108. 2003.

FORTES RC, GUIMARÃES NG, HAACK A, TORRES AAL, CARVALHO KMB. Orlistat e sibutramina: bons coadjuvantes para perda e manutenção de peso?. **Rev Bras Nutr Clin.**; 21(3): 244-51. 2006.

FRALOUB JC, et al. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in c57bl/6 mice fed a high fat diet. **J Clin Biochem Nutr.** 46(3):1-12. 2010.

FRANCISCHI RPP, PEREIRA LO, FREITAS CS, KLOPPER M, SANTOS RC, VIEIRA P, LANCHETA-JUNIOR AH. Obesity: updated information about its etiology, morbidity and treatment. **Rev. Nutr.** 13:17-28. 2000.

GAGLIARDI, J. Obesidade: conceito e avaliação. **Nutrição Saúde e Performance**, v. 3, n. 14, p. 5-7, dez. 2001.

GONZÁLEZ FHD, SILVA SC. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 1.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003, 270p. 2003.

GRANDY DK, ZHANG YA, BOUVIER C, ZHOU QY, JOHNSON RA, ALLEN L, BUCK K, BUNZOW JR, SALON J, CIVELLI O. Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. **Proc Natl Acad Sci USA** 88:9175-9179. 1991.

GREENGARD P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**. 2;294(5544):1024-30. 2001.

GREENWAY FL, DUNAYEVICH E, TOLLEFSON G, *et al.* NB-201 Study Group. Comparison of combined bupropion and naltrexone therapy for obesity with monotherapy and placebo. **J Clin Endocrinol Metab**. 94 (12):4898-906. 2009.

GREENWAY FL, FUJIOKA K, PLODKOWSKI RA, *et al.* Effect of naltrexone plus bupropion on weight loss in overweight and obese adults (COR-I): a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. **Lancet**, 376:595-605. 2010.

GUH DP, ZHANG W, BANSBACK N, AMARSI Z, BIRMINGHAM CL, ANIS AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**. Mar 25;9:88. 2009.

GUILÁ MVM. Obesidad: interrelación genética ambiental. **Rev. Méd. Clín. Condes** 14(3): [6 p.]. 2003.

GUIVARCH D, VINCENT JD, VERNIER P. Alternative splicing of the D2 dopamine receptor messenger ribonucleic acid is modulated by activated sex steroid receptors in the MMQ prolactin cell line. **Endocrinology**. 139:4213-4221. 1998.

GUY-GRAND B. Long-term pharmacotherapy in the management of obesity. In: Björntorp P, Rössner S, editors. *From Theory to Practice: Obesity in Europe*: 88. London: **John Libbey**, 311-8; 1989.

GUYTON AC, HALL JE. **Text Book of Medical Physiology**. 11^a ed. Filadelfia: Elsevier Saunders, 2006.

HAFAEEZ S, AHMED MH. Bariatric Surgery as Potential Treatment for Nonalcoholic Fatty? Liver Disease: A Future Treatment by Choice or by Chance, **Journal of Obesity**. 201:11; 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3569911/pdf/JOBES2013-839275.pdf>>. Acesso em 05 de novembro de 2017.

HALFORD JC. *et al.* Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.61, n.2, p.159–168, 1998.

HALPERN B. Combinação de bupropiona com naltrexone no tratamento da obesidade. **ABESO** 56 – abril 2012.

HALTIA LT, RINNE JO, MERISAARI H, MAGUIRE RP, SAVONTAUS E, HELIN S, NÅGREN K, KAASINEN V. Effects of intravenous glucose on dopaminergic function in the human brain in vivo. **Synapse**. 61(9):748-56; 2007.

HANDIN R: **Bleeding and thrombosis in Harrison's Principles of Internal Medicine**, 14^a Ed. McGraw-Hill; Chapt 60: 339-345 1998.

HARISON et al. **Harrison medicina interna**. 17 edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. vol. 1. 2008.

HÖKFELT T, ELDE R, JOHANSSON O, LUFT R, NILSSON G, AND ARIMURA A. Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin containing and substance P containing primary afferent neurones in the rat. **Neuroscience**, 1: 131-136. 1976.

HOLLANDER P, GUPTA AK, PLODKOWSKI R, et al. Effects of naltrexone sustained-release/bupropion sustained-release combination therapy on body weight and glycemic parameters in overweight and obese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**. Dec; 36(12):4022–4029. 2013.

HUANG XF, ZAVITSANOU K, HUANG X, YU Y, WANG H, CHEN F, LAWRENCE AJ, DENG C. Differential expression of dopamine D2 and D4 receptor and tyrosine hydroxylase mRNA in mice prone, or resistant, to chronic highfat diet-induced obesity. **Molecular Brain Research**. 135:150-61. 2005.

IVERSEN SD, IVERSEN LL. Dopamine: 50 years in perspective. **Trends Neurosci**, v.30, n.5, May, p.188-93. 2007.

JACKSON DM, WESTLIND-DANIELSSON A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. **Pharmacol Ther**. 64:291–370. 1994.

JENNER P. The rationale for the use of dopamine agonist in Parkinson's disease. **Neurology** KEBABIAN JW. Multiple Receptors for Dopamine. **Nature**, v.277, p.93-6, 1979.45(Suppl 3): S6-S12. 1995.

KELLEY AE, BERRIDGE KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. **J Neurosci**. May 1; 22(9):3306-11. 2002.

KELLEY AE. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. **Neurosci Biobehav Rev**, v.27, n.8, Jan, p.765-76. 2004.

KENNETT GA, CLIFTON PG. New approaches to the pharmacological treatment of obesity: can they break through the efficacy barrier? **Pharmacol. Biochem. Behav**. 97, 63–83; 2010.

KERR MG. **Exames laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2. ed. São Paulo: Roca, parte II, p. 81-163, 2003.

KHAN A, RAZA S, KHAN Y, AKSOY T, KHAN M, WEINBERGER Y, GOLDMAN J. Current updates in the medical management of obesity. **Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov**, 6(2), 117-128. 2002.

KISHI T, ELMQUIST JK. Body weight is regulated by the brain: a link between feeding and emotion. **Mol Psychiatry**, v.10, n.2, Feb, p.132-46. 2005.

KONNOPKA A, BÖDEMANN M, KÖNIG HH. Health burden and costs of obesity and overweight in Germany. **Eur J Health Econ**. Aug; 12(4):345-52 2011.

LAGE FB, GUERRA HMM, PELOGIA NCC. Efeito da farinha da casca de maracujá no peso e no índice glicêmico de ratos. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**. São Paulo. 8 (44): pp.84 -91. 2014.

LEE MW, FUJIOKA K. Naltrexone for the treatment of obesity: review and update. **Expert Opin Pharmacother**.10(11):1841-5. 2009.

LENARD NR, BERTHOUD HR. Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. **Obesity (Silver Spring)**, v.16 Suppl 3, Dec, p.S11-22. 2008.

LEVITT, M., S. SPECTOR, A. SJOERDSMA, AND S. UDENFRIEND: Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. **J. Pharmacol. exp. Ther.** 148, 1–8. 1965.

LI Y, SOUTH T, HAN M, CHEN J, WANG R, HUANG XF. High-fat diet decreases tyrosine hydroxylase mRNA expression irrespective of obesity susceptibility in mice. **Brain Res**. 1268, 181–189. 2009.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) **method. Methods**; 25:402–408. [PubMed: 11846609]. 2001.

LUTTER M, ERIC JN. Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. **The Journal of Nutrition**, 139:629–632. 2009.

MAGALHÃES CP, FREITAS MFL, NOGUEIRA MI, CAMPINA RCFC, TAKASE LF, SOUZA SL, CASTRO RM. Modulatory role of serotonin on feeding behavior. **Nutritional Neuroscience**, Volume 13, 2010.

MAGNI P, et al. Feeding behavior in mammals including humans. **Ann N Y Acad Sci**; 1163:221–32. 2009.

MANCINI MC, HALPERN, A. Tratamento Farmacológico da Obesidade. Arq. Bras. **Endocrinol. Metabol.** 46, 497–512. 2002.

MARTIN DW, MAYES PA, RODWELL YW. HARPER'S Review of Biochemistry. Califórnia: **Lange Medical**; 688 p. 1981.

MATOS LC, Martins B. Hepatites tóxicas: Revisão da literatura. **Ver Soc Port Med Int.**, v. 12 (4), p. 239-258, 2005.

McELVAIN JS, SCHENK JO. A multisubstrate mechanism of striatal dopamine uptake and its inhibition by cocaine. **Biochemistry Pharmacology** 43: 2189-2199, 1992.

MEISTER B. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. **Physiol Behav**, v.92, n.1-2, Sep 10, p.263-71. 2007.

MENDONÇA CP, ANJOS LA. Dietary and physical activity factors as determinants of the increase in overweight/obesity in Brazil. **Cad. Saúde Pública.** 20: 698-709; 2004.

MILLER O, Gonçalves RR. **Laboratório para o clínico.** 8. ed. São Paulo: Editora Arheneu; 607 p. 1999.

MISSALE C, NASH SR, ROBINSON SW, JABER M, CARON MG. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol Rev.** 78:189- 225. 1998.

MORTON GJ, CUMMINGS DE, BASKIN DG, BARSH GS, SCHWARTZ MW. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature.** 443:289–295 15. 2006.

MOTTA VT. **Bioquímica Clínica para o Laboratório** – Princípios e Interpretações. Editora Médica Missau, 4º edição, 2003.

MÜLLER-RIEMENSCHNEIDER F, REINHOLD T, BERGHÖFER A, WILLICH SN. Health-economic burden of obesity in Europe. **Eur J Epidemiol**; 23:499-509. 2008.

MUNIZ GS, SILVA AM, CAVALCANTE TC, SILVA-FRANÇA AK, FERRAZ KM, NASCIMENTO E. Early physical activity minimizes the adverse effects of a low-energy diet on growth and development parameters. **Nutritional Neuroscience.** 16 (3): p. 113-124, 2013.

MUST A, JACQUES PF, DALLAL GE, BAJEMA CJ, DIETZ WH. Long term morbidity and mortality of overweight adolescents. **N England J Med**; 327: 1379-1380. 1992.

MUST A, Strauss RS. Risks and consequences of childhood and adolescent obesity. **Int J Obes.** 23(Suppl 2): S2-S11. 1999.

NAGATSU T, LEVITT M, UDENFRIEND S. Tyrosine hydroxylase: The initial step in norepinephrine biosynthesis. **J Biol Chem.** 239:2910– 2917; 1964.

NEVE KA, SEAMANS JK, TRANTHAM-DAVIDSON H. Dopamine receptor signaling. **Journal of receptor and signal transduction research.** 24:165–205. 2004.

NEGRÃO BA, LICINO J. Leptina: O Diálogo Entre Adipócitos e Neurônios. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo.** Vol. 44. Num. 3. p. 205-214. 2000.

NERY M. Hipoglicemia como Fator Complicador no Tratamento do Diabetes Melito tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 52(2):288-98. 2008.

NIH – National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. **Overweight and Obesity Statistics.** Em: <http://www.win.niddk.nih.gov/publications>. 2012. Consultado em 22.11.2017.

NOVELLI EL, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111-119, 2007.

OLIVEIRA TWS, et al. A perinatal palatable high-fat diet increases food intake and promotes hypercholesterolemia in adult rats. **Lipids.** Nov;46(11):1071-4. 2011.

O'RAHILLY, S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. **Nature.** 19;462(7271):307-14. 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ (OMS/OPAS). **Panorama da Segurança Alimentar e Nutricional na América Latina e Caribe.** Disponível em: <<http://www.paho.org/bra/index.>>. Acesso em: 25 out. 2017.

PADWAL R. Contrave, a bupropion and naltrexone combination therapy for the potential treatment of obesity. **Curr Opin Investig Drugs;** 10(10):1117-25, 2009.

PADWAL S, SHARMA, AM, FRADETTE M, JELINSKI S, et al. The evaluating self-management and educational support in severely obese patients awaiting multidisciplinary bariatric care (EVOLUTION) trial: rationale and design. **BMC Health Serv Res.**13:321. 2013.

PAPPA E, FILIPPATOS TD, ELISAF MS. Naltrexone/Bupropion ER for the treatment of obesity **Hell J Atheroscler,** 7: 131-139. 2016.

PIERCE R.C, KALIVAS DW. Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. **Journal of Neuroscience,** 17:3254-3262, 1997.

POWELL AG, APOVIAN CM, ARONNE LJ. New drug targets for the treatment of obesity. **Clin. Pharmacol. Ther.** 90, 40–51; 2011.

PRADO SE, ALMEIDA DR, MELO AL. Controle do Apetite e Exercício Físico: Uma Atualização. **Revista Brasileira Ciência e Movimento**. Vol. 16. Num. 2. p. 109-116. 2008.

SILVA SL, NASCIMENTO AA, RIBEIRO EFB, RIBEIRO RB, ALVES AM, SANTOS AM, BURMANN APR, NETO, RAM. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas de Parahancornia amapa (Apocynaceae). **Acta Amazônica**. Vol 46 (1): 73-80. 2016.

SILVA TL. et al. Efeito da ingestão de farinha de taioba sobre o peso corporal de ratos previamente alimentados com óleo de soja e banha suína. SaBios: **Revista Saúde e Biologia**, v. 10, n. 2, p. 27-34, 2015.

RAO KR, Lal N, Giridharan NV. Genetic & epigenetic approach to human obesity. The Indian **Journal of Medical Research**. 140(5):589-603; 2014.

RECH RR, HALPERN R, et al. Obesidade infantil: complicações e fatores associados. **Rev Bras Ciênc Mov**; 15(4): 111-20. 2007.

REPETTO G, RIZZOLLI J, BONATTO C. Prevalência, riscos e soluções na obesidade e sobrepeso: Here, There and Everywhere. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. Vol. 47. Num. 6. p. 633- 635. 2003.

ROBINSON S, SANDSTROM SM, DENENBERG VH, PALMITER RD. Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards. **Behav Neurosci**. 119:5-15; 2005.

ROBBINS; COTRAN. **Bases Patológicas das Doenças, Patologia**. 2005; 7ª. Ed. Editora Elsevier. 2005.

RUNGE CF. Economic consequences of the obese. **Diabetes**; 56:2668-72. 2007.

SAKURAI M, NAKAMURA K, NAKAGAWA H. et al. Dietary carbohydrate intake, presence of obesity and the incident risk of type 2 diabetes in Japanese men. **J. Diabetes Investing**. v. 7, n. 3, p. 343-351, maio, 2016.

SALZANO, F. T.; CORDÁS, T. A. Tratamento farmacológico de transtornos alimentares. **Rev. Psiq. Clin.**, v. 31, n. 4, p. 188-194, 2004.

SANTIAGO, M.; MACHADO, A.; CANO, J. Dopamine release and its regulation in the CNS. In: CNS Neurotransmitters and Modulators. Dopamine. Stone T.W. (ed). **CRC Press**, pp. 41-64, 1996.

SANTOS ACA, LOPES ACT, CRUZ GCX, GARCIA BC et al. Estudo biométrico de ratos alimentados com dois tipos de dieta. **Colloquium Vitae**, 2(2): 01-05. 2010.

SARKHOSH K, BIRCH DW, SHARMA A, KARMALI S. Complications associated with laparoscopic sleeve gastrectomy for morbid obesity: a surgeon's guide. **Can J Surg**. 56(5): 347–52. 2013.

SCHMIDT MI, DUNCAN BB, SILVA GA, MENEZES AM, MONTEIRO CA, BARRETO SM, *et al*. Chronic noncommunicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet**. Jun; 9(11):60135-9. 2011.

SIBLEY DR, MONSMA FJJR. Molecular biology of dopamine receptors. **Trends Pharmacol Sci** 13,61-69. 1992.

SIEGEL SJ, MAXWELL CR, MAJUMDAR S, TRIEF DF, LERMAN C, GUR RE, KANES SJ, LIANG Y. Monoamine reuptake inhibition and nicotine receptor antagonism reduce amplitude and gating of auditory evoked potentials. **Neuroscience**. 133:729 – 738; 2005.

SILVA MC, SOUZA JA, SANTOS LO, PINHEIRO IL, BORBA TKF, SILVA AAM, CASTRO RM, SOUZA SL. Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease** (Print), (5): 219-228. 2014.

SIMPSON KA, MARTIN NM, BLOOM SR. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. 53(2):120-8, 2009.

SOUZA SP. *et al*. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera* (Less.) DC, Asteraceae: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 3, p. 450-455, maio/jun. 2011.

STONE TW. CNS Neurotransmitters and Modulators. Dopamine. **CRC Press**, 1996.

SUGANAMI T, NISHIDA J, OGAWA YA. Paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v.25, n.10, p. 2062-8, 2009.

SVENNINGSSON P, NISHI A, FISONE G, GIRAULT JA, NAIRN AC, GREENGARD P. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 44:269-96. 2004.

TARAZI FI. Neuropharmacology of dopamine receptors: Implications in neuropsychiatric diseases. **SQU Journal for Scientific Research Medical Sciences**, v.3, p.87-104. 2001.

THRALL MA. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Caps 21, 22, 23 e 26. São Paulo: Roca, 2007.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **The Surgeon General's call to action to prevent and decrease overweight and obesity**. [Rockville, MD]: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General; [2001]. Available from: US GPO, Washington.

VALLONE D, PICETTI R, BORRELLI E. Structure and function of dopamine receptors. **Neurosci Biobehav Rev**; 24:125-132. 2000.

VERGE D, CALAS A. Serotonergic neurons and serotonin receptors: gains from cytochemical approaches. **J Chem Neuroanat**, v.18, n.1-2, Feb, p.41-56. 2000.

VIKRAM K. YERAGANI, MANUEL TANCER, PRATAP CHOKKA, GLEN B. BAKER. Arvid Carlsson, and the story of dopamine, **Indian J Psychiatry**. Jan-Mar; 52(1): 87–88. 2010.

VUCETIC Z, KIMMEL J, TOTOKI K, HOLLENBECK E, REYES TM. Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. **Endocrinology**. 151: 4756–64. 2010.

WADDEN TA, FOREYT JP, FOSTER GD *et al*. Weight loss with naltrexone SR/bupropion SR combination therapy as an adjunct to behavior modification: the COR-BMOD trial. **Obesity**, v.19, p.110–120, 2011.

WANDERLEY EM, FERREIRA VA. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciênc Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 185-194, 2010.

WANG GJ, VOLKOW ND, LOGAN J, PAPPAS NR, WONG CT, ZHU W, *etal*. Brain dopamine and obesity. **Lancet**. 357(9253):354-7. 2001.

WANG LY, DENNISTON M, LEE S, GALUSKA D, LOWRY R. Long-term health and economic impact of preventing and reducing overweight and obesity in adolescence. **J Adol Health**; 46:467-73. 2010.

WANNMACHER L. Obesidade: evidências e fantasmas. **Rev. Uso Racional de Medicamentos**, v. 1, n. 3, p. 1-6, 2004.

WARDLE J. Eating behaviour and obesity. **Obes Rev**, v.8 Suppl 1, Mar, p.73-5. 2007.

WATTS RL. The role of dopamine agonists in the early Parkinson's disease. **Neurology**, 49:S34-S48. 1997.

WHO Consultation on Obesity. **Preventing and Managing the Global Epidemic**. Geneva: World Health Organization, 1998.

WITHROW D, Alter DA. The economic burden of obesity worldwide: A systematic review of the direct costs of obesity. **Obes Rev.**; 12(2):131-41. 2011.

WOLTERS EC. The role of D1 and D2 dopamine receptors in motor behavior of patients with Parkinson's disease. **Eur J Neurol.** 3 (Suppl 1):19-24. 1996.

WOODS SC, SEELEY RJ, RUSHING PA, et al. A controlled high fat diet induces an obese syndrome in rats. **J Nutr** 133: 1081–1087. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Media Centre Obesity and Overweight**. Fact Sheet N° 311. Updated March. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. 2004. Disponível em: <[http:// www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/](http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/)>. Acesso em: 03 out. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. 2017. Disponível em: <[http:// www.who.int/features/factfiles/obesity/en/](http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/)>. Acesso em: 25 out. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Physical status: the use and interpretation of anthropometry**. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 1995. (Technical Report Series, No. 854).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The challenge of obesity – quick statistics**. 2008. Acesso: 22-dez de 2017 Em: <http://www.euro.who.int/en/healthtopics/noncommunicable-diseases/obesity/data-and-statistics>

YANOVSKI SZ, YANOVSKI JA. Naltrexone-Extended Release plus Bupropion-Extended Release for Treatment of Obesity. **JAMA**. March 24; 313(12): 1213–1214. 2015.

ANEXO A - Ofício da Comissão de Ética em Experimentação Animal – CCS/UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 12 de fevereiro de 2015.

Ofício nº 11/15

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

Para: Prof^a. Sandra Lopes de Souza
Departamento de Anatomia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.053208/2014-57

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, **“Efeito da associação naltrexona/bupropiona sobre a via de sinalização dopaminérgica do coportamento alimentar em ratos Wistar obesos”**.

Concluimos 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 do Departamento de Nutrição da UFPE; Animais: ratos heterogênicos; Linhagem: Wistar; Idade: 21, 60, 90 dias; Peso: 50, 220, 250g; Sexo: machos e fêmeas; Nº total de animais: 54.

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

CCB: Integrar para desenvolver