

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MARLY PEDROZA DE ALBUQUERQUE

**EFEITO DO TRATAMENTO COM A ASSOCIAÇÃO
NALTREXONA/BUPROPIONA EM RINS DE RATOS OBESOS: UMA ANÁLISE
HISTOPATOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA**

Recife
2020

MARLY PEDROZA DE ALBUQUERQUE

**EFEITO DO TRATAMENTO COM A ASSOCIAÇÃO
NALTREXONA/BUPROPIONA EM RINS DE RATOS OBESOS: UMA ANÁLISE
HISTOPATOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Prof^o. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Recife
2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- A345e Albuquerque, Marly Pedroza de.
Efeitos do tratamento com a associação naltrexona/bupropiona em
rins de ratos obesos: uma análise histopatológica, morfométrica e
estereológica / Marly Pedroza de Albuquerque. – 2020.
63 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientadora: Manuela Figueiroa Lyra de Freitas.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2020.
Inclui referências e anexos.
1. Bupropiona. 2. Doenças renais. 3. Naltrexona. 4. Obesidade. I.
Freitas, Manuela Figueiroa Lyra de (Orientadora). II. Título.

616.07

CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2020-113)

MARLY PEDROZA DE ALBUQUERQUE

**EFEITO DO TRATAMENTO COM A ASSOCIAÇÃO
NALTREXONA/BUPROPIONA EM RINS DE RATOS OBESOS: UMA ANÁLISE
HISTOPATOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de mestre em Patologia.

Aprovada em: 13/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lisiane dos Santos Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jaciel Benedito de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Ao meu esposo, Cláudio e meus filhos, Lara e Lucas que me permitem ser melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

À Deus

Aos meus pais Juliêta Carneiro e Miguel Pedroza (*in memoriam*), a quem devo tudo que sou.

Ao meu esposo, Claudio, por toda paciência, por estar sempre ao meu lado me apoiando e incentivando.

Aos meus filhos Lara e Lucas que me fazem sentir todos os dias a grandeza que é ser mãe.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Patologia pela contribuição na minha formação e por todo o suporte ao longo desses anos.

À FACEPE por acreditar e apoiar financeiramente esse trabalho.

A todos os professores pelos ensinamentos, assistência e confiança.

Aos meus amigos do mestrado (Patologia-UFPE 2017) pelos momentos compartilhados e por toda ajuda nos experimentos. Foram dois anos de muito companheirismo e amizade.

Ao Prof. Dr Nicodemos Teles de Pontes Filho, pela sua disponibilidade e gentileza em colaborar na construção desse trabalho.

À minha orientadora Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas, por toda disponibilidade, orientações e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os integrantes do programa de Pós-Graduação em Patologia-UFPE. Em especial à Arthur Clark e Silvana Paz, por quem tenho um grande carinho e a quem sou muito grata por toda ajuda. À Margarete Valdevino, uma pessoa sempre muito gentil comigo e com todos.

Enfim, agradeço a todos, que de alguma forma estiverem envolvidos para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada por fazerem parte da minha trajetória!

RESUMO

As nefropatias têm como fator de risco mais importante a obesidade, além disso, diversas drogas usadas em doenças metabólicas podem afetar os rins. Objetivo: Analisar os efeitos da associação naltrexona/bupropiona sobre os tecidos renais de ratos Wistar obesos. Metodologia: Foram utilizados 36 ratos da linhagem Wistar, machos, com 21 dias de nascidos. Os animais classificados como normonutridos receberam dieta balanceada padrão e foram separados em dois grupos: NCT (n = 9) submetido ao tratamento antiobesidade pela associação naltrexona/bupropiona (1mg/20mg/kg) e NST (n = 9) o qual foi submetido à aplicação subcutânea de solução salina 1mg/kg. Os ratos obesos receberam dieta hipercalórica ocidentalizada e também foi dividida em dois grupos: obesos submetidos ao tratamento com naltrexona/bupropiona (OCT, n = 9) e obesos sem tratamento (OST, n = 9). Aos 122º dias de vida, foi realizada a obtenção e fixação do rim para análise macroscópica e, posteriormente, o processamento dos dados histológicos. Resultados: Os ratos obesos com tratamento ($0,32g \pm 0,05$) e sem tratamento ($0,33g \pm 0,03$) apresentaram menor peso relativo renal quando comparados aos normonutridos ($0,39g \pm 0,03$); $p < 0,05$. Os ratos obesos submetidos ao tratamento (OCT) apresentaram uma redução no volume do córtex ($52,9g \pm 6,8 \times 42,4g \pm 6,2$, $M \pm DP$; $p < 0,05$) e aumento do volume da medula renal ($14,2g \pm 6,0 \times 25,9g \pm 11,3$, $M \pm DP$; $p < 0,05$). Conclusão: Não foi observado alterações nas análises microscópicas realizadas nos rins dos animais obesos; aparentemente o uso de naltrexona/bupropiona nesses animais não traz malefícios ao órgão.

Palavras-chave: Bupropiona. Doenças Renais. Naltrexona. Obesidade.

ABSTRACT

Nephropathy has obesity as its most important risk factor and several drugs used in metabolic diseases can affect the kidneys. Objective: To analyze the effects of naltrexone / bupropion association on the renal tissues of obese Wistar rats. Methodology: 36 male Wistar rats were used. The animals classified as normonutritives received a standard balanced diet and were divided into two groups: TN (n = 9) submitted to antiobesity treatment by the association naltrexone / bupropion (1mg / 20mg / kg) and NTN (n = 9) which was submitted to subcutaneous application of saline solution 1mg / kg. The obese rats received westernized hypercaloric diet and were also divided into two groups: obese submitted to naltrexone / bupropion treatment (TO, n = 9) and obese without treatment (NTO, n = 9). At 122 days of age, the kidney was obtained and fixed for macroscopic analysis and, subsequently, the processing of histological data. Results: Normonutritive rats had a higher relative renal weight ($0.39g \pm 0.03$) when compared to obese without treatment ($0.33g \pm 0.03$) or treated ($0.32g \pm 0.05$); $p < 0.05$. Obese rats undergoing treatment (TO) showed a reduction in cortex volume ($52.9g \pm 6.8$ x $42.4g \pm 6.2$, $M \pm SD$; $p < 0.05$) and increased renal medulla volume ($14.2g \pm 6.0$ x $25.9g \pm 11.3$, $M \pm SD$; $p < 0.05$). Conclusion: The use of naltrexone / bupropion in obese animals apparently does not harm renal functions. However, further studies are necessary to increase the time of drug use as well as detailed analyzes of renal histology.

Keywords: Bupropion. Kidney Diseases. Naltrexone. Obesity.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

Figura 1- Funções do sistema renal	17
Figura 2- Estrutura renal e do néfron	18
Figura 3- Cápsula Glomerular	19
Figura 4- Prevalência e Projeção da Obesidade no mundo	21
Figura 5- Fatores relacionados à obesidade	22
Figura 6- Ação da Naltrexona/Bupropiona. POMC = pró-opiomelanocortina; MC3R e MC4R = receptores 3 e 4 de melanocortina; α -MSH = hormônio estimulante de α -melanócitos.....	30

Materiais e Métodos

Figura 1- Fluxograma do protocolo de tratamento e divisão dos grupos	32
Figura 2- Processamento do material para análise.....	36
Figura 3- Ilustração do esquema de randomização para fotografia (A e B) e campo selecionado para análise da imagem na objetiva de 10x (C).....	37
Figura 4- Distribuição de pontos para o cálculo da área do espaço capsular.....	38
Manuscrito - Efeitos da associação naltrexona/bupropiona em rins de ratos obesos: uma análise histopatológica e morfométrica.	44

Figura 1- Processamento do material para análise.....	44
Figura 2- Distribuição de pontos para o cálculo da área do espaço capsular.....	46
Figura 3- Volume total dos rins (μm^3) em ratos <i>Wistar</i>	47
Figura 4- Volume do córtex renal (μm^3) em ratos <i>Wistar</i>	48
Figura 5- Volume medular (μm^3) em ratos <i>Wistar</i>	49

LISTA DE TABELAS

Referencial Teórico

Tabela 1 - Classificação do estado nutricional para adultos (20 a 60 anos)	25
Tabela 2 - Medicamentos autorizados pela FDA para tratamento da obesidade.....	28

Material e métodos

Tabela 1- Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta padrão de biotério (normocalórica) oferecida aos animais experimentais.....	32
Tabela 2 – Tratamento e dose aplicada nos quatros grupos.....	33

Manuscrito - Efeito do tratamento com a associação naltrexona/bupropiona em rins de ratos obesos: uma análise histopatológica, morfométrica e estereológica.

Tabela 1- Tratamento e dose aplicada nos quatros grupos.....	42
Tabela 2 - Comprimento (cm) e peso relativo renal (g/g) de ratos Wistar.,.....	47
Tabela 3- Número de glomérulos (unidade), número de glomérulos atroficos (unidade), espaço urinário (μm^2) e densidade glomerular (μm^3), em ratos Wistar.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABESO	Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica
α -MSH	Hormônio estimulante de α -melanócitos
CB	Centro de Biociências
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIOMS	Council for International Organizations for Medical Science
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
dANAT	Departamento de Anatomia
DRC	Doença Renal Crônica
FDA	<i>Foods and Drugs Association</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HE	Hematoxilina e eosina
ICLAS	International Council for Laboratory Animal Science
IMC	Índice de Massa Corporal
IRA	Insuficiência Renal Aguda
LEAAL	Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos
NIH	National Institute of Health
OMS	Organização Mundial de Saúde
POMC	Pró-opiomelanocortina
Pós-Pat	Programa de Pós-Graduação em Patologia
SUS	Sistema Único de Saúde
TCD	Túbulo contorcido distal
TCP	Túbulo contorcido proximal
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USA	<i>United States of America</i>
VET	Valor Energético Total

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	JUSTIFICATIVA.....	16
4	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
4.1	HISTOFISIOLOGIA RENAL.....	17
4.2	OBESIDADE.....	20
4.2.1	Conceito e Epidemiologia.....	20
4.2.2	Aspecto Socio-Econômico da Obesidade.....	22
4.2.3	Etiologia e Fisiopatologia.....	23
4.2.4	Diagnóstico da Obesidade.....	24
4.2.5	Doenças Associadas à Obesidade.....	25
4.2.6	Doença Renal Crônica.....	26
4.2.7	Tratamentos para Obesidade.....	27
4.2.8	Naltrexona/Bupropiona.....	29
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	31
5.2	TIPO, LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO E PERÍODO DE REALIZAÇÃO.....	31
5.3	OBTENÇÃO E CUIDADOS COM OS ANIMAIS.....	31
5.4	DEFINIÇÃO E GRUPOS DE ESTUDOS.....	32
5.5	TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	33
5.6	COLETA, OBTENÇÃO DOS DADOS MACROSCÓPICOS E FIXAÇÃO DOS RINS.....	34
5.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA DOS RINS.....	35
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
6	MANUSCRITO - EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ALTREXONA/BUPROPIONA EM RINS DE RATOS OBESOS: UMA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA.....	40
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXO A - OFÍCIO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO	

ANIMAL-CEEA/UFPE.....	62
ANEXO B – DIETAS OCIDENTALIZADAS DE CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO ELABORADAS PELO DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO DA UFPE (DIETA MODIFICADA DE CAVALCANTE ET AL., 2013).....	63

1 INTRODUÇÃO

O rim é um órgão altamente complexo, possuindo mais de 20 tipos de células especializadas, que ao ser danificado apresenta sintomas agudos e crônicos. Patologicamente, na Insuficiência Renal Aguda (IRA) ocorre necrose tubular, apoptose, mudanças na barreira de filtração, vasoconstrição, obstrução tubular, edema no interstício e ativação das enzimas proteolíticas. A Doença Renal Crônica (DRC) por sua vez é caracterizada pela fibrose e cicatrização do túbulo intersticial por tentar substituir células renais danificadas por células tubulares funcionais, porém as mesmas são incapazes de restaurar muitas outras funções como a produção de eritropoietina e ativação da vitamina D (MOON et al., 2016). As nefropatias têm como fator de risco mais importante a obesidade por sua forte associação com a diabetes e a hipertensão, as duas etiologias mais comuns de doença renal em estágio final (WICKMAN e KRAMER, 2013; KOVESDY et al., 2017; WHALEY-CORNNELL e SOWERS, 2017; SUN et al., 2017).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define obesidade como acúmulo de gordura anormal ou excessiva que pode prejudicar a saúde. Tem como indicador o Índice de Massa Corpórea (IMC), que quando elevado ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$) indica obesidade. Ainda segundo a OMS, em 2016, mais de 1,9 milhões de indivíduos com 18 anos ou mais tinham sobrepeso, dos quais mais de 650 milhões eram obesos. A prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes (5 a 19 anos de idade) aumentou dramaticamente de 4% em 1975 para 18% em 2016 (WHO, 2018).

A alta prevalência da obesidade trouxe sérias preocupações em termos de saúde pública, uma vez que está associada a um aumento significativo da morbidade e da mortalidade em todo o mundo, refletindo em problemas de saúde e econômicos que requerem estratégias coordenadas para prevenir e tratar esse distúrbio (ARNOLD et al., 2016; QUEIROZ et al., 2017).

Como alternativas para o tratamento desta doença vem sendo utilizado as cirurgias bariátricas, tratamentos dietéticos, terapias cognitivas-comportamental e a utilização de alguns fármacos (ABESO, 2016). Várias são as opções de medicamentos, que vão desde psicoestimulantes a antidepressivos e antagonistas opioides. A associação desses dois últimos foi liberada para tratamento da obesidade pelo FDA (*Foods and Drugs Association* – Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos) em 2014, com o nome comercial de Contrave®. A associação naltrexona/bupropiona é uma combinação de naltrexona, um antagonista opioides e de bupropiona, um antidepressivo da classe da

aminocetona, um inibidor do neurônio de receptação de dopamina e noraepinefrina (CRISTOU, 2015; IGEL et al., 2017). Essa combinação utilizada com objetivo anoréxico foi associada a resultados positivos em detrimento a utilização dessas drogas separadamente no tratamento contra a obesidade (WRIDGHT e RODGERS, 2013).

Tendo em vista que os rins são alvos de diversas drogas usadas em doenças metabólicas como a obesidade (VICENT, 2017), torna-se importante o conhecimento da ação do Contrave® sobre este órgão. Na literatura atual pouco se sabe sobre o efeito dessa associação naltrexona/bupropiona no aspecto histomorfométrico dos rins de animais obesos. Desta forma, faz-se necessário a investigação, com o intuito de estabelecer informações a respeito da ação dessa combinação nos rins, sabendo que a obesidade é um fator de risco para nefropatias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar histomorfometricamente o efeito do tratamento com a associação naltrexona/bupropiona sobre os tecidos renais de ratos Wistar obesos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em rins de ratos obesos e controle (normonutridos), com e sem tratamento, utilizando a associação naltrexona/bupropiona, os seguintes aspectos:

- Comprimento e peso dos rins após fixação;
- Calcular o volume de córtex, volume de região medular e volume total dos rins;
- Quantificar o número estimado de glomérulos normais e possíveis glomérulos com alterações histopatológicas;
- Calcular a densidade glomerular;
- Verificar possível alteração de tamanho na área correspondente ao espaço urinário.

3 JUSTIFICATIVA

Há evidência de que a obesidade por si só leva a doença renal, no entanto mais estudos são necessários para entender melhor essa associação. Estudos realizados com ratos obesos demonstram alterações histomorfométricas nos rins destes animais (SUN et al., 2017 e YANG et al. 2017).

Em consulta à literatura médica pertinente, torna-se notória a ausência de pesquisas relacionadas a possíveis alterações renais decorrentes do uso de drogas antiobesidades. Desta forma, é necessária a realização de estudos que esclareçam possíveis efeitos do tratamento com a associação naltrexona/bupropiona sobre o parênquima renal, sobretudo que pode haver uma maior fragilidade destes órgãos frente a um quadro de obesidade, e a importância do acompanhamento destes órgãos já comprometidos.

Sendo assim, o entendimento desta associação, contribuirá para oferecer mais subsídios aos profissionais mediante a indicação desta abordagem terapêutica para o tratamento desta pandemia, tornando-a mais segura.

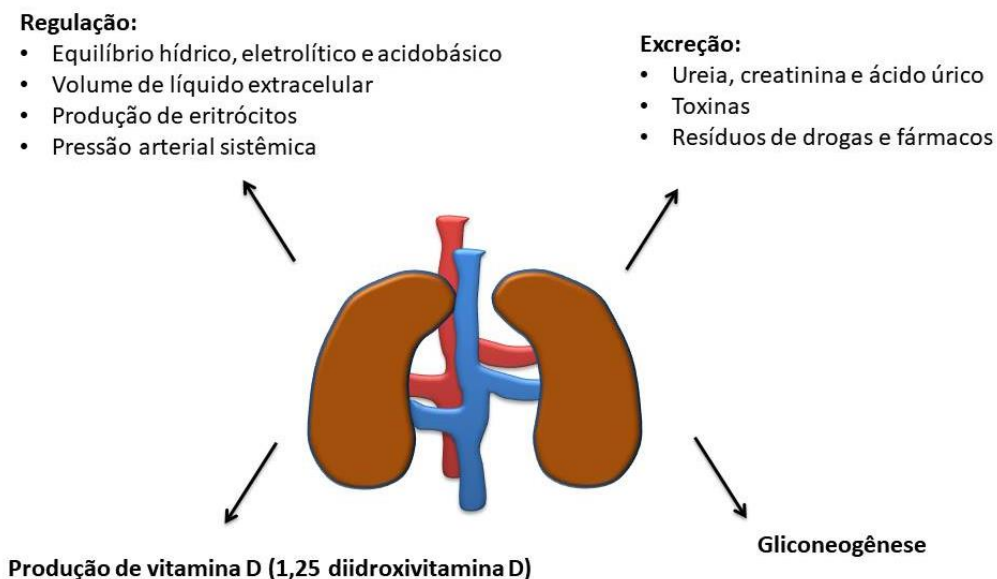
4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 HISTOFISIOLOGIA RENAL

O rim é um órgão de grande magnitude na homeostase do corpo, tanto pela quantidade de funções que exerce, como pela importância dessas funções para a homeostasia e vitalidade do organismo. Possui diversas funções regulatórias, como regulação do equilíbrio hídrico, eletrolítico e acidobásico, do volume de líquido extracelular, da osmolaridade plasmática e da produção de eritrócitos (produção de hormônios como eritropoietina). Além disso, exerce funções hormonais que atuam na regulação da pressão arterial sistêmica, atuando na resistência vascular e na produção de vitamina D (1,25 diidroxivitamina D) participando da integridade dos ossos. (GUEUTIN et al., 2012; ODIGIE, 2014; EATON e POOLER, 2015; GUYTON e HALL, 2017).

Ainda sobre a função do sistema renal, podemos destacar a participação do processo de gliconeogênese durante o jejum prolongado e excreção dos produtos de degradação metabólica (metabolitos produzidos no organismo como ureia, creatinina e ácido úrico) e de outras substâncias estranhas ao organismo, como toxinas e resíduos de drogas e fármacos (medicamentos) (Figura 1) (GUEUTIN et al., 2012; ODIGIE, 2014; EATON e POOLER, 2015; GUYTON e HALL, 2017).

Figura 1- Funções do Sistema Renal.

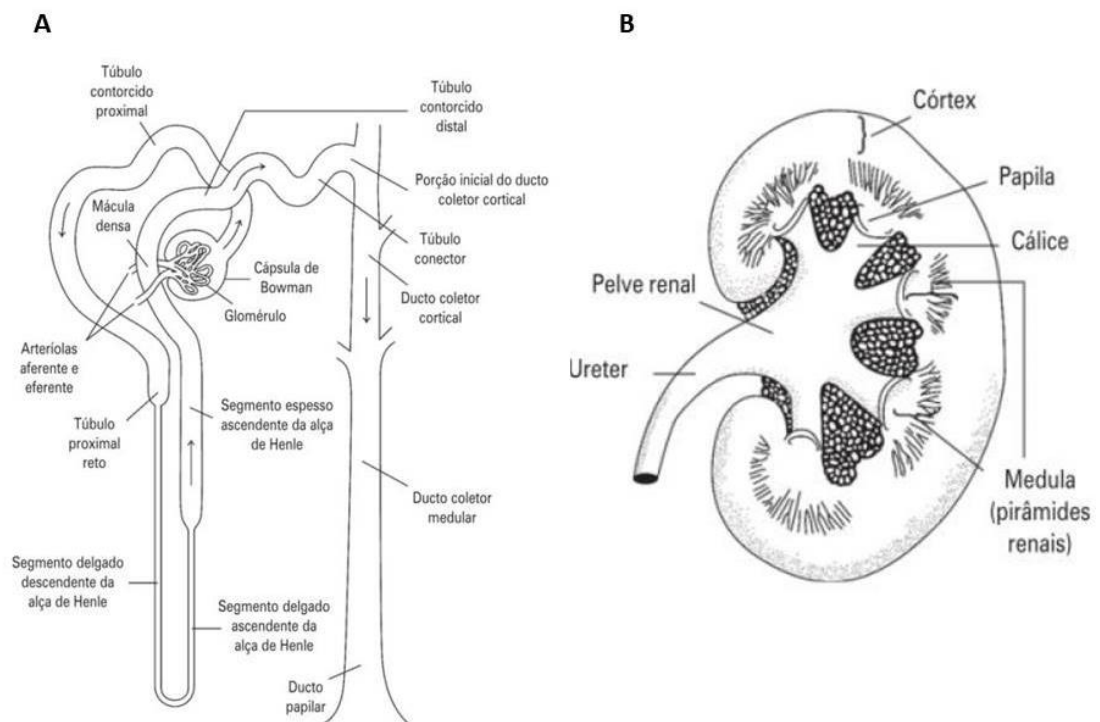


Fonte: Arquivo dos autores.

Em mamíferos, os dois rins recebem aproximadamente 25% do sangue proveniente do débito cardíaco, possuindo a capacidade de detectar o excesso ou deficiência de água e eletrólitos específicos, e atuam alterando o ritmo de reabsorção ou secreção dessas substâncias (GUEUTIN et al., 2012; ODIGIE, 2014; EATON e POOLER, 2015; GUYTON e HALL, 2017).

A unidade morfofuncional básica do rim é o néfron, uma estrutura histológica de composição básica epitelial, entrelaçado com vasos sanguíneos, que modificam sequencialmente o líquido filtrado para formar a urina final (Figura 2 A). Cada rim contém cerca de 1 milhão de néfrons. O néfron se inicia como um componente esférico de filtração, denominado corpúsculo renal, que consiste em um enovelado capilar (o glomérulo renal), envolvido por uma cápsula de parede dupla (a Cápsula Glomerular) (Figura 2 A) (GUEUTIN et al, 2012; AL-SAMAWY, 2012; EATON e POOLER, 2015; GUYTON e HALL, 2017; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

Figura 2 - Estrutura Renal e do Néfron.

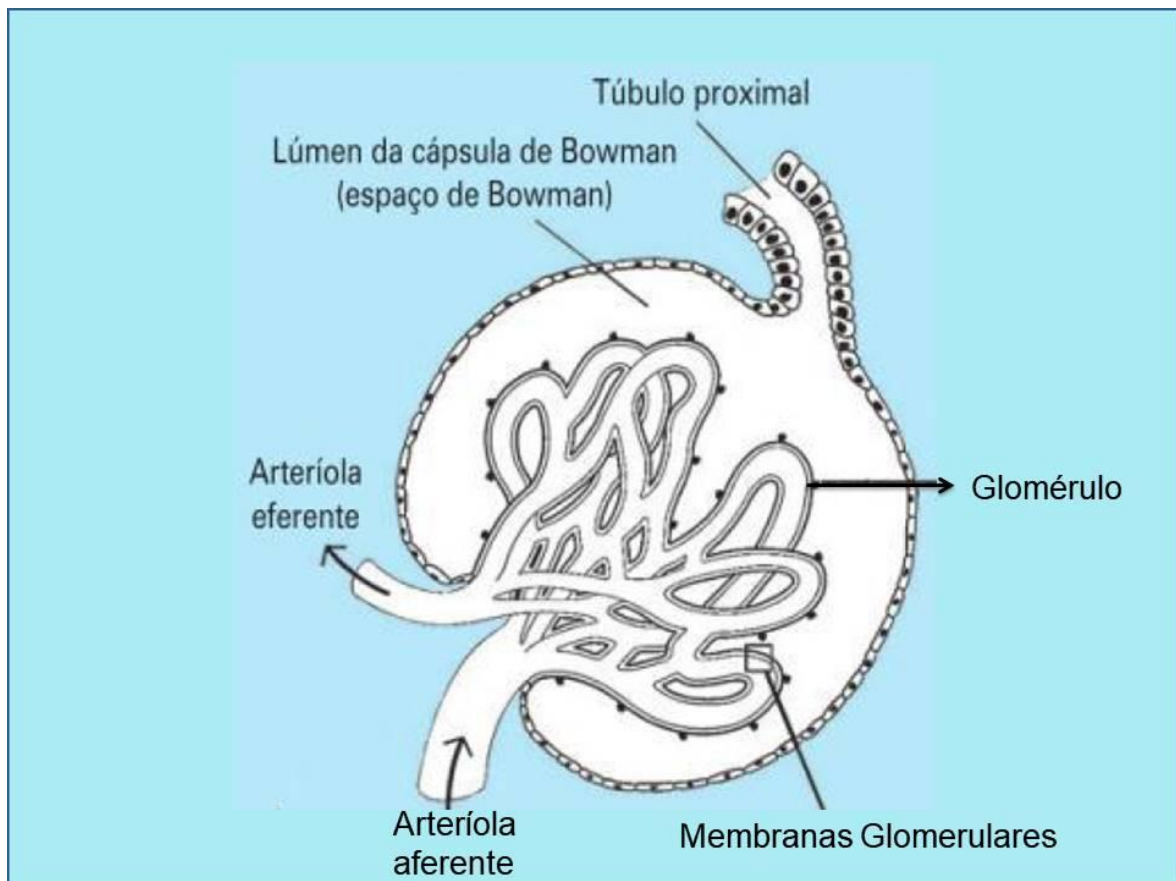


Fonte: Adaptado de Eaton e Pooler (2004).

A cápsula glomerular (Figura 3) é formada por duas camadas celulares finas: a camada parietal externa e a camada visceral interna, que se relaciona com os capilares sanguíneos para

que ocorra a ultrafiltração do sangue. Entre a camada parietal, que consiste em uma camada simples de epitélio escamoso, e a camada visceral, existe um espaço estreito, chamado de espaço urinário, que capta o resultado da filtração sanguínea (filtrado glomerular, que é a urina primária), contínuo com o lúmen do túbulo contorcido proximal (TCP) (AL-SAMAWY, 2012; SANTOS, 2014; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

Figura 3 - Cápsula Glomerular.



Fonte: Adaptado de Eaton e Pooler (2004).

O líquido resultante da filtração glomerular assemelha-se a composição do plasma sanguíneo, contendo principalmente, os íons inorgânicos e solutos orgânicos de baixo peso molecular, praticamente na mesma concentração que é observada no plasma sanguíneo. O volume de filtrado formado por unidade de tempo é conhecido como Taxa de Filtração Glomerular (TFG) (EATON e POOLER, 2015; GUYTON e HALL, 2017).

Em seguida, a Cápsula Glomerular se continua como um longo túbulo, dividido em TCP, alça de Henle ou do néfron (dividida em parte descendente e ascendente), e túbulo contorcido distal (TCD) (Figura 2 A). Cada néfron se comunica com um túbulo coletor, que recebe a urina secundária produzida por vários néfrons. Histologicamente, os néfrons

possuem uma lâmina basal que o conecta ao tecido conjuntivo adjacente (GUEUTIN et al, 2012; AL-SAMAWY, 2012; EATON e POOLER, 2015; GUYTON e HALL, 2017; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

Macroscopicamente, os néfrons organizam-se para formar nos rins duas regiões anatômicas distintas, o córtex e a medula renal. A medula renal é formada por um conjunto de formações de conformação piramidal, cujo ápice, denominado de papila renal, apresenta uma série de aberturas que correspondem às desembocaduras dos túbulos coletores que compõem o hilo juntamente com nervos, artéria e a veia renal, localizado na parte medial do rim (Figura 2 B). Cada rim é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, podendo possuir uma camada distinta de músculo liso na sua porção mais profunda (GUEUTIN, 2012; AL-SAMAWY, 2012; EATON e POOLER, 2015; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

O volume total do plasma sanguíneo de um indivíduo saudável circula pelos rins várias vezes por dia. Desta forma, essa grande circulação sanguínea, possibilita a filtração, a reabsorção de solutos importantes para o organismo e a excreção de grandes quantidades de produtos resultantes do metabolismo celular. Sendo assim, fica evidente a importância vital destes órgãos como reguladores precisos dos constituintes do meio interno, devendo ser prevenido de possíveis lesões que afetem seu funcionamento adequado (GUEUTIN, 2012; EATON e POOLER, 2015; GUYTON e HALL, 2017).

No indivíduo obeso ocorre hiperfiltração glomerular, que quando associada a alterações metabólicas, como aumento da pressão sanguínea, resistência insulínica, entre outras, resultam em dano renal, com injúria dos néfrons, resultando em nefrites, levando à redução da taxa de filtração glomerular, e alterando a composição dos fluídos corpóreos, como por exemplo, leva ao acúmulo de produtos tóxicos ao organismo, prejudiciais quando presentes em altas concentrações (EATON e POOLER, 2015; SILVA JR., 2017).

4.2 OBESIDADE

4.2.1 Conceito e epidemiologia

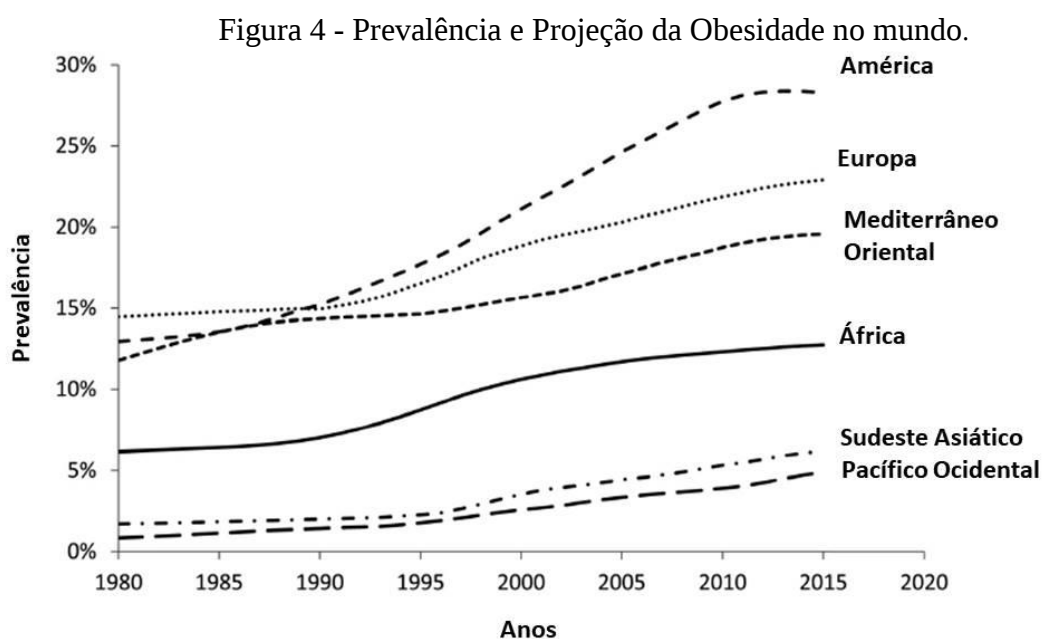
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é uma doença complexa decorrente do acúmulo anormal e excesso de gordura corporal, de forma que possa atingir graus capazes de afetar a saúde do indivíduo. Esse acúmulo de gordura corporal, normalmente tende a ser progressivo, levando a uma série de alterações a saúde física e

também a saúde mental. Sua prevalência vem crescendo acentuadamente nos últimos anos, transformando-se no mais grave problema de saúde pública do mundo, atingindo proporções epidêmicas, superando até mesmo a desnutrição e as doenças infecciosas (FERREIRA e BENICIO, 2015; WHO, 2018).

Mundialmente o número de crianças e adolescentes obesos, de 5 a 19 anos, aumentou 10 vezes nas últimas quatro décadas e, permanecendo as tendências atuais, estima-se que em 2022 haverá mais crianças obesas do que com desnutrição moderada e grave. Experiências no leste da Ásia, da América Latina e do Caribe, países de média renda, observaram que a transição do baixo peso, ao excesso de peso e obesidade ocorreu de forma rápida, podendo indicar um alto consumo de alimentos pobres em nutrientes e densos em energia, como os carboidratos altamente processados, resultando em IMC mais alto e problemas de saúde ao longo da vida (EZZATI et al., 2017).

A obesidade está crescendo de forma geral no mundo e se apresentando como importante fator de risco para o câncer e as doenças metabólicas, cardiovasculares, musculoesqueléticas e renais (ARNOLD et al., 2016; KOVESDY et al., 2017; PICON-RUIZ et al., 2017; HOTAMILISGIL, 2107).

No Brasil, a projeção dos resultados de estudos realizados nas últimas três décadas indica um comportamento epidêmico. Observa-se aumento gradativo da obesidade e do sobrepeso desde a infância até a idade adulta (Figura 4) (ABESO, 2016; CHOOI, DING, MAGKOS 2019).



Fonte: Adaptado de Chooi, Ding & Magkos (2019).

Essa crescente prevalência vem sendo associada a vários processos biopsicossociais, nos quais não apenas o indivíduo e suas escolhas, mas também o ambiente político, econômico, social e cultural, torna-se um lugar estratégico na análise do problema e nas possíveis intervenções (DIAS et al., 2017).

4.2.2 Aspecto sócio-econômico da obesidade

A obesidade resulta de um desequilíbrio entre ingestão calórica e a energia dispersa. Assim essa epidemia global é impulsionada pela urbanização e estilos de vida insalubres caracterizados por atividade física reduzida, dietas com excesso de gorduras e carboidratos e aumento do estresse (VERNARELLI et al. 2018; NANSSEU et al., 2019).

A Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society*), refletindo essa visão, acrescentou recomendações para as ações comunitárias às suas diretrizes de prevenção ao câncer, as quais incluem o aumento ao acesso de alimentos saudáveis, diminuindo a disponibilidade de alimentos de baixo valor nutricional e desenvolvimento de ambientes propícios à recreação e transportes ativos. Além disso, a ênfase na redução de consumo de calorias discredicionárias, particularmente refrigerantes açucarados e lanches salgados, pode ser uma alavanca promissora para redução do excesso de peso e a obesidade (STURM e AN, 2014).

A maior taxa de aumento da obesidade ocorre em populações com maior grau de pobreza e menor nível educacional. Pode-se explicar essa associação pela maior palatabilidade e pelo baixo custo de alimentos de grande densidade energética (ABESO, 2016). É necessário reconhecer que o excesso de peso é um grave problema de saúde pública que exige intervenções como, por exemplo, elaborar programas para reduzir o consumo de comidas não saudáveis, aumento de impostos sobre bebidas açucaradas, entre outras alternativas (HOQUE, 2016).

Em contrapartida uma grande barreira na gestão e prevenção da obesidade é que a perda de peso devido a mudanças de estilo de vida sozinha é intrinsecamente difícil. Para muitos, isso significa que a perda de peso induzida por dieta inicialmente resulta em efeitos benéficos tangíveis, mas frequentemente seguida por um retorno à ingestão de energia anterior e consequentemente um aumento de peso rebote. Sabe-se que existem muitos mecanismos neurobiológicos e fisiológicos que regulam o equilíbrio energético. Tem-se tornado cada vez mais evidente que o cérebro desempenha um papel importante na detecção

de demandas e armazenamento de energia para manter/defender o peso corporal (GAUTRON et al., 2015; GOBEL, 2017).

Uma revisão sistemática sobre o impacto econômico do sobrepeso demonstrou que o excesso de peso representa entre 0,7% e 2,8% da despesa total referente à saúde de um país (WITHROW, 2011). Os custos médicos associados à obesidade são estimados em mais de US\$ 200 bilhões e são responsáveis por mais de 20% de todas as despesas anuais de cuidados de saúde nos Estados Unidos. Os custos de saúde das pessoas obesas são 42% maiores do que aqueles de peso normal (GOBEL, 2017). Estimou-se que o Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil gasta anualmente cerca de R\$ 3,6 bilhões por ano com o tratamento de doenças relacionadas com a obesidade, sendo R\$ 2,4 bilhões com o tratamento hospitalar (68%) e R\$ 1,2 bilhões (32%) com o tratamento ambulatorial (BAHIA et al., 2012).

Sabe-se que, 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; BERTHOUD e KLEIN, 2017).

Sturm e An (2014) relatam que os aspectos econômicos, políticos, sociais e físicos desempenham um importante papel na epidemia da obesidade. Em suas pesquisas, muitos fatores foram atribuídos como causas do aumento de peso: lanche, automóvel, televisão, *fast food*, uso de computadores, máquinas de venda automática, desenvolvimento de habitação suburbana, a pobreza, a riqueza, o supermercado e até a ausência de supermercados (“deserto alimentar”).

4.2.3 Etiologia e fisiopatologia

Até pouco tempo, a principal causa da obesidade tinha origem no excesso de alimentação. Porém, estudos relataram que a causa vai além da relação entre a ingestão de alimentos e gasto energético. É uma doença crônica de causa multifatorial. Sendo resultante da complexa interação entre diversos fatores, atuantes, na maioria dos casos, de forma combinada, sejam eles genéticos, metabólicos, fisiológicos, sociais, comportamentais e culturais, que podem contribuir para o acúmulo de gordura corporal (BARBIERE e MELLO, 2012).

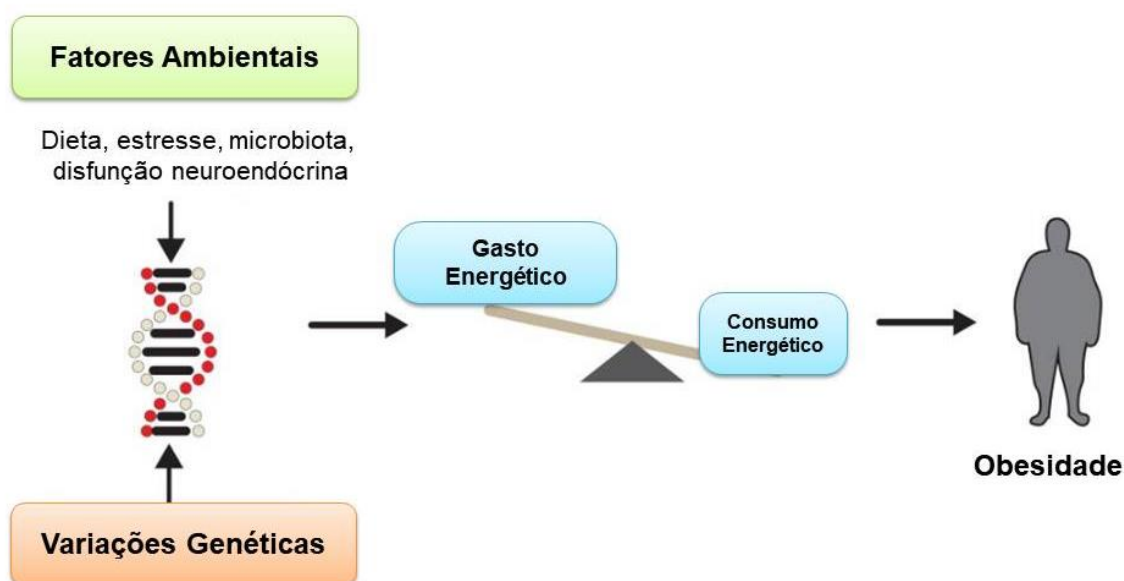
Nas últimas décadas, a população está aumentando o consumo de alimentos com alta densidade calórica, alta palatabilidade, baixo poder sacietógeno e de fácil absorção e digestão.

Estas características favorecem o aumento da ingestão alimentar e, portanto, contribuem para o desequilíbrio energético (ABESO, 2016).

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 (ALBUQUERQUE et al., 2016; OBRI e CLARET, 2019).

Fatores neuroendócrinos são diagnosticados como sendo os mais relevantes para a manutenção do balanço energético do organismo (Figura 5). Diversos sinais são capazes de aumentar a termogênese e estimular a saciedade em momentos de muita oferta energética. Esses sinais são capazes também de promover o contrário, estimulando a fome e inibindo a termogênese em momentos de privação. Entre esses mediadores, os mais importantes são a leptina, a grelina e a insulina (CUI et al., 2017).

Figura 5 - Fatores relacionados à obesidade.



Fonte: Adaptado de Obri & Claret (2019)

4.2.4 Diagnóstico da obesidade

O diagnóstico da obesidade pode ser feito através da aferição da massa corporal do indivíduo, sendo o método mais utilizado é o Índice de Massa Corporal (IMC). Ele não mede diretamente a proporção de gordura no corpo, mas é o recurso mais utilizado para estimar a

prevalência de obesidade por ser um método de fácil execução, simples, prático e também por ser aceito pela comunidade científica. O IMC é estimado pela relação entre as seguintes variáveis: peso e altura, em que o peso é dividido pela sua altura ao quadrado (kg/m^2) (HERNANDES e PEREIRA, 2010). Segundo a definição da OMS, considera-se obesidade quando o IMC encontra-se igual ou acima de 30kg/m^2 (WHO, 2018).

A classificação do estado nutricional segundo o valor do Índice de Massa Corporal do adulto pode ser vista na tabela 1.

Tabela 1 – Classificação do estado nutricional para adultos (20 a 60 anos) .

Classificação do estado nutricional	Pontos de corte
Baixo peso	<18,5 kg/m^2
Eutrófico	>18,5 e <25 kg/m^2
Sobrepeso	>25 e <30 kg/m^2
Obesidade I	>30 e <35 kg/m^2
Obesidade II	>35 e <40 kg/m^2
Obesidade III	>40 kg/m^2

Fonte: ABESO (2016).

Além do IMC outras medidas devem ser levadas em conta para o diagnóstico da obesidade, tais como: o perímetro da cintura, a razão cintura-estatura, o índice de conicidade, radiografia, ultra-sonografia, ressonância magnética, condutividade elétrica total, análise de bioimpedância elétrica e espessura das dobras cutâneas (PELEGRINI et al., 2015).

4.2.5 Doenças associadas à obesidade

Dentre as comorbidades que se associam a obesidade incluem os distúrbios cardiovasculares (como hipertensão arterial sistêmica, doença arterial coronariana, doença cérebro-vascular), distúrbios endocrinometabólicos (por exemplo, diabetes mellitus tipo II, dislipidemia, hipotireoidismo), distúrbios respiratórios (por exemplo, apneia obstrutiva do sono, síndrome da hipoventilação), alterações gastrointestinais (como colecistite, hérnia de hiato, esteatose hepática) (MELDRUM et al., 2017).

A obesidade ainda pode ser a causa de alguns tipos de cânceres (por exemplo, câncer de endométrio, fígado e rim), alterações músculo-esqueléticas (maior predisposição a artrose, osteoartrite), doença renal, alterações dermatológicas (como estrias, papilomas, dermatites),

problemas reprodutivos (esterilidade, alterações menstruais) distúrbios psicossociais (mudança de humor, isolamento social, depressão). Além de outras implicações, como o aumento do risco cirúrgico e também a diminuição da agilidade física (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017).

A mesma é responsável por provocar uma inflamação crônica de baixo grau no indivíduo. Observa-se cada vez mais que esta inflamação contribui para comorbidades associadas a essa e que o tecido adiposo é um órgão imunologicamente ativo secretando uma variedade de adipocinas, bem como citocinas pró e anti-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1b (IL-1b) e adiponectina e IL-10, respectivamente. Essas proteínas são capazes de modificar a sensibilidade à insulina dentro do tecido adiposo e sistemicamente, promovendo também expansão e remodelamento do mesmo (GRANT, 2015; CARDINALI, 2017; WEDELL-NEERGAARD et al., 2018; GALMÉS, 2019).

Nas doenças cardiovasculares (DCV) observa-se a presença da IL-18, que tem a capacidade de estimular a produção de interferon gama (IFN- γ), estando provavelmente implicado na patogênese da aterosclerose (WEDELL-NEERGAARD et al., 2018). Em obesos mórbidos o tecido adiposo pode representar até 50% da massa corporal total sendo capaz de influenciar a inflamação sistêmica, representando um compartimento principal do sistema imunológico (GRANT, 2015).

Sabe-se que a obesidade contribui para o aumento da prevalência das doenças renais (YASUI et al., 2008; EDVARDSSON et al., 2013; ANTONELLI et al., 2014). Por sua forte associação com diabetes e hipertensão, sendo as duas etiologias mais comuns de doença renal em estágio final, a obesidade deve ser considerada como fator de risco mais importante para a DRC (WICKMAN e KRAMER, 2013; WEBSTER et al., 2017).

4.2.6 Doença Renal Crônica

A DRC contribui para um milhão de mortes por ano. Dentre as doenças não transmissíveis, foi a que mais contribuiu para o aumento da morbidade e mortalidade nos últimos 20 anos (WHALEY-CORNNELL e SOWERS, 2017). Projeções de prevalência de DRC nos Estados Unidos para 2020 e 2030, entre indivíduos acima de 30 anos, estima-se que a doença passará de 13,2% em 2010 para 14,4% em 2020 e 16,7% em 2030 (HOERGER et al., 2014).

Alguns fatores na obesidade afetam a função renal ao longo do tempo, como a hiperinsulinemia, o mecanismo compensatório devido à resistência à insulina, bem como a

hiperglicemia e dislipidemia. Em relação à hemodinâmica intrarrenal a obesidade altera a hemodinâmica intraglomerular, aumentando o fluxo plasmático renal e a TFG, ocorrendo uma hiperfiltração, o que contribui para a albuminúria. A hiperfiltração aumenta ainda mais pela expansão do volume extracelular e reabsorção de sódio no túbulo proximal e alteração do feedback túbuloglomerular (WHALEY-CORNELL e SOWERS, 2017).

A TFG é o melhor indicador de alteração da função renal, que representa a quantidade total de fluido filtrado por todos os néfrons em funcionamento por unidade de tempo. O diagnóstico da DRC baseia-se no estabelecimento de uma redução crônica da função renal e estrutural danos nos rins (LEVEY et al., 2015). É estabelecida quando a TFG é menor que 60 ml/min/1,73 m², ou através de outros marcadores de danos renais (um ou mais) como: a albuminúria, anormalidades estruturais e alterações histológicas; ou ambos, com duração de pelo menos três meses, independente da causa subjacente (KDIGO, 2012).

4.2.7 Tratamentos para Obesidade

Segundo a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO), existe uma grande variedade de tratamentos direcionados para reduzir o excesso de peso. Dentre eles, os mais utilizados são mudança no estilo de vida, melhora dos hábitos alimentares, prática de exercício físico regularmente, acompanhamento psicológico, uso de fitoterápicos, uso de fármacos antiobesidade e, quando o tratamento clínico não mostra resultado significativo, o tratamento cirúrgico através da cirurgia bariátrica (ABESO, 2016).

A obesidade é uma doença que requer uma abordagem multifacetada incluindo melhorias em longo prazo na alimentação e na atividade física. Embora a modificação do estilo de vida seja a central abordagem de qualquer programa de perda de peso, a farmacoterapia para obesidade pode fornecer uma opção adicional para esses indivíduos que não conseguiram perder ou manter peso com modificação de estilo de vida sozinho (GOLDEN, 2017).

Quando existe uma eficácia limitada das abordagens comportamentais, surge a possibilidade de tratamento por meio de opções farmacológicas. A terapêutica farmacológica pode ser recomendada nos indivíduos com um IMC (Índice de Massa Corporal) maior ou igual 30 kg/m² ou naqueles com cujo IMC é maior ou igual 27 kg/m² que apresentam comorbidades associadas, e, de forma adjuvante, modificação da dieta e a realização de atividade física (YANOVSKI e YANOVSKI, 2015; ABESO, 2016; WHARTON et al., 2017).

A *Food and Drugs Association* dos EUA (FDA) autoriza cinco medicamentos para emagrecer com uso em longo prazo (Tabela 2).

Tabela 2 – Medicamentos autorizados pela FDA para tratamento da obesidade.

Medicamentos	Ação
Orlistat	Inibição da lipase pancreática, reduzindo a absorção de gordura dietética do intestino, limitando assim a ingestão calórica.
Lorcaserina	Agonista de receptores de serotonina que regula o apetite e a sensação de saciedade.
Naltrexona-bupropiona	Influenciam o sistema hipotalâmico da melanocortina e atenuam o sistema de recompensa para alimentação.
Fentamina-topiramato (associação de um psicoestimulante e um anticonvulsivo)	Aumenta o gasto energético e reduz o apetite.
Liraglutida	Agonista do receptor de péptido-1 (GLP-1) de ação prolongada, que atua no hipotálamo para reduzir a fome e aumentar a saciedade.

Fonte: Khera et al., 2016; Saltiel, 2016; Nuffer et al., 2016; Dong, 2017; Golden, 2017. FDA - *Food and Drugs Association*.

O objetivo da farmacoterapia antiobesidade não é apenas reduzir o ganho de peso, mas também melhorar as condições comórbidas associadas. A eficácia das opções de medicamentos atuais geralmente é de 5% a 10% de redução do peso corporal dos pacientes bem-sucedidos, a perda de peso pode ser maior quando várias abordagens são utilizadas simultaneamente (IGEL et al., 2017).

No entanto, a terapia farmacológica deve ser utilizada com precaução, pois apresentam efeitos colaterais potenciais que limitam a sua utilidade, incluindo taquicardia e hipertensão, náuseas e vômitos, diarreia, pancreatite, doença da vesícula biliar, esteatorreia, incontinência fecal e flatulência (SALTIEL, 2016; IGEL et al., 2017).

Além disso, poucas são as drogas seguras e eficazes para a obesidade. Estudos recentes sobre processos reguladores de homeostase energética têm colaborado para o desenvolvimento de novos fármacos contra a fisiopatologia da obesidade. A terapia combinada de naltrexona/bupropiona tem sido eficaz, e por isso, alvo de inúmeros estudos. A associação destas drogas mostrou ter um efeito sinérgico, ou seja, maior do que a soma dos

efeitos observados de cada medicação na perda de peso (GREENWAY et al., 2010; WADDEN et al., 2011; CLAPPER et al., 2013).

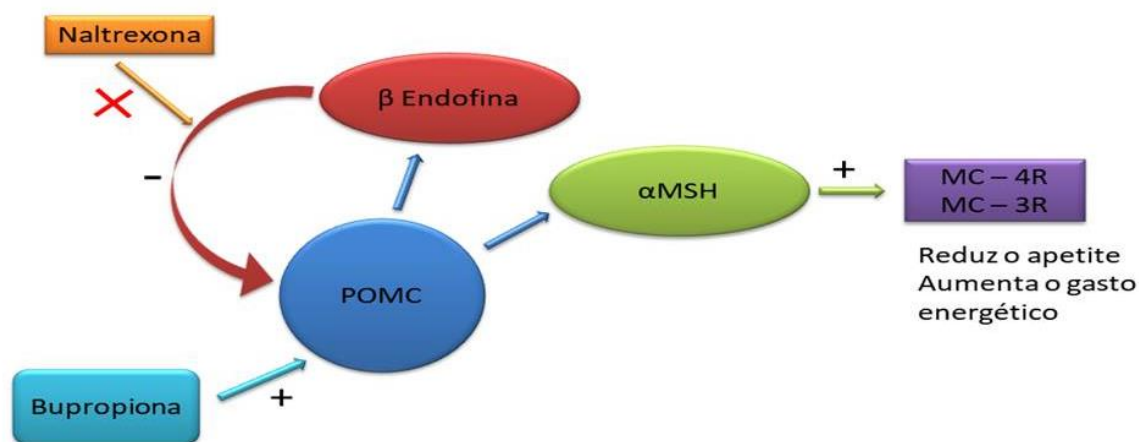
4.2.8 Naltrexona e Bupropiona

A naltrexona é um antagonista dos receptores opióides, liberada pelo FDA para o tratamento de dependentes de álcool. Quando usado para tratar obesidade não produziu efeitos significativos. A bupropiona é um inibidor não seletivo do transportador de dopamina e do transportador de noradrenalina. É autorizado pelo FDA para o tratamento de tabagismo. Quando utilizado para tratar obesidade também não demonstrou resultados satisfatórios (BELLO, 2019).

A bupropiona aumenta a concentração da dopamina e da noradrenalina no sistema nervoso central. 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 α -MSH (hormônio estimulante de α -melanócitos) e beta-endorfinas. O α -MSH é uma substância reconhecidamente anorexigênica, agindo nos receptores 3 e 4 de melanocortina (MC3R e MC4R) e que também aumenta o gasto energético. Porém o efeito da bupropiona no peso 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. Um excesso de beta-endorfina leva a um aumento do consumo alimentar em roedores, principalmente de alimentos mais palatáveis. No entanto, a naltrexona é exatamente um antagonista opioide, e, portanto, das beta-endorfinas. Assim, o efeito anorexigênico da bupropiona poderia ser mais pronunciado por não ser mais inibido pelas beta-endorfinas (Figura 6) (HALPERN, 2012; VERPEUT e BELLO, 2014; YANOVSKI e YANOVSKI, 2015; WILDING, 2017).

A associação dessas duas drogas tem demonstrado resultados significativos no tratamento para obesidade (VERPEUT e BELLO, 2014; CHRISTOU e KIORTSIS, 2015; GUERDJIKOVA et al., 2017). Em 2014, o FDA aprovou o naltrexona-bupropiona, que está sob exclusividade de patentes nos EUA até 2030 e é vendido como Contrave®. Os principais efeitos colaterais dessa associação são: náusea, constipação, dor de cabeça, vômito, tontura, insônia, boca seca e diarreia (BELLO, 2019).

Figura 6 - Ação da Naltrexona/Bupropiona. POMC = pró-opiomelanocortina; MC3R e MC4R = receptores 3 e 4 de melanocortina; α -MSH = hormônio estimulante de α -melanócitos.



Fonte: Adaptado de Halpern (2012).

A associação naltrexona-bupropiona tem demonstrado uma eficácia maior que todos os outros fármacos, perdendo apenas para a fentamina-topiramato. No entanto o perfil de segurança da naltrexona-bupropiona tem efeitos adversos menos graves que aquele, sendo esse bem tolerado, apresentando como efeito adverso mais relatado a náusea (VERPEUT e BELLO, 2014).

A naltrexona e seus metabólitos são excretados principalmente pelos rins (53% a 79% da dose). A depuração renal da naltrexona varia de 30 a 127 mL / min, sugerindo que a eliminação renal é principalmente por filtração glomerular. A excreção fecal é uma caminho de eliminação menor. O tempo médio de meia vida é de aproximadamente 5 horas. Enquanto o tempo de meia-vida estimada para a bupropiona é de aproximadamente 21 horas. Cerca de 90% e 10% da dose administrada desta droga são eliminadas na urina e nas fezes, respectivamente (CONTRAVE, 2014).

Apresentando maior proporção de eliminação por vias urinárias, não se sabe se traz malefícios pra o rim ou se é seguro para os aspectos morfofuncionais.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O uso dos animais do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA/CCB/UFPE) através do processo: 23076.053208/2014-57 (Anexo A), de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Foram utilizados 36 ratos albinos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*) procedentes do biotério de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

5.2 TIPO, LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO E PERÍODO DE REALIZAÇÃO

Estudo do tipo experimental em ratos da linhagem *Wistar*. Realizado no laboratório de Histologia do Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, no período de agosto de 2017 a julho de 2019. O tempo proposto foi de três meses para a obtenção do modelo de obesidade acrescido do tempo de uso das substâncias testadas, coleta e processamento do material e análises.

5.3 OBTENÇÃO E CUIDADOS COM OS ANIMAIS

Foram utilizados 36 ratos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*), machos, 21 dias, provenientes da colônia do biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e mantidos no biotério do Departamento de Anatomia (DANAT) da mesma instituição. O biotério apresenta fluxo de pessoas e insumos definidos, e é protegido por barreiras sanitárias (sistema de filtração de exaustão na altura das gaiolas). Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas (três animais por gaiola de polipropileno com dimensão de 41 x 34 x 16 cm), temperatura de 22 ± 2 °C, ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas das 6:00 as 18:00 horas), umidade relativa em torno de 50%, exaustão de ar e aclimatados um mês antes da realização dos procedimentos, segundo as recomendações éticas. Todas as manipulações experimentais foram realizadas no período diurno.

5.4 DEFINIÇÃO E GRUPOS DE ESTUDOS

Após os 21 dias para o desmame, os animais foram divididos em dois grupos de animais: 18 com alimentação normal (normonutridos) e 18 animais com alimentação hipercalórica para induzir a obesidade.

Os animais normonutridos tiveram acesso à dieta balanceada padrão para roedores do biotério da marca Presence®, composta de: farelo de milho, farelo de trigo, farelo de soja, carbonato de cálcio, fosfato, bicálcico, cloreto de sódio, aminoácido e premix mineral vitamínico, cujos macronutrientes se encontram na tabela 1.

Tabela 1 – 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	9,00
Fibras	5,00	0,00
VET (Kcal/g)	3,30	3,30

As informações da composição centesimal da ração comercial para ratos e camundongos de laboratórios 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.

Os animais que tiveram acesso à dieta hipercalórica ocidentalizada receberam uma mistura da ração comercial Presence® junto a alimentos hipercalóricos: maisena, biscoito maisena de chocolate, farinha de soja, caseína, celulose, óleo de milho, óleo de soja, banha sadia, manteiga, margarina, creme de leite, açúcar, sais – mix mineral, vitaminas, colina, metionina, BHT, NaCl e glutamato monossódico, com fornecimento calórico de 4,0 kcal/g.

A dieta ocidentalizada foi preparada no Departamento de Nutrição da UFPE, produzida para as fases de crescimento e manutenção do rato com uso de acordo com a idade do animal, apresentando variações nos componentes palatáveis para cada uma delas, mas com preservação dos teores nutricionais. As versões da dieta ocidentalizada, crescimento e manutenção foram baseadas em estudos anteriores (CAVALCANTE et al., 2013). Na fase de crescimento, esta teve seus valores de proteínas em torno de 18g%, lipídios 17g%, carboidratos 44g% e fibras 5,2% com fornecimento médio de 4,0Kcal/g; A dieta de manutenção situou-se em torno de 14% de proteínas, 18% de lipídios e 47% de carboidratos e 5,2% de fibras com fornecimento médio de 4,0Kcal/g (Anexo B).

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.

Análises foram realizadas no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos da Universidade Federal de Pernambuco (LEAAL/UFPE) com base nas informações fornecidas pelo fabricante dos ingredientes da dieta Ocidentalizada para crescimento/manutenção (Rhostrer indústria e Comércio) e da dieta padrão de biotério (Presence® Ratos e Camundongos - Purina do Brasil S/A).

Após 78 dias de dieta, já estabelecido o quadro de obesidade (animais entre 15-20% a mais de peso do que os animais controles normonutridos). Os ratos foram separados em quatro grupos (n = 9 animais por grupo) conforme Figura 1, dando-se início ao tratamento farmacológico. As doses terapêuticas de segurança utilizadas para o tratamento antiobesidade pela associação Naltrexona/bupropiona foram de 1mg/20mg/kg (Sigma-Aldrich®; Toronto Research Chemicals, North York, ON) uma vez ao dia (WRIGHT e RODGERS, 2013).

5.5 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

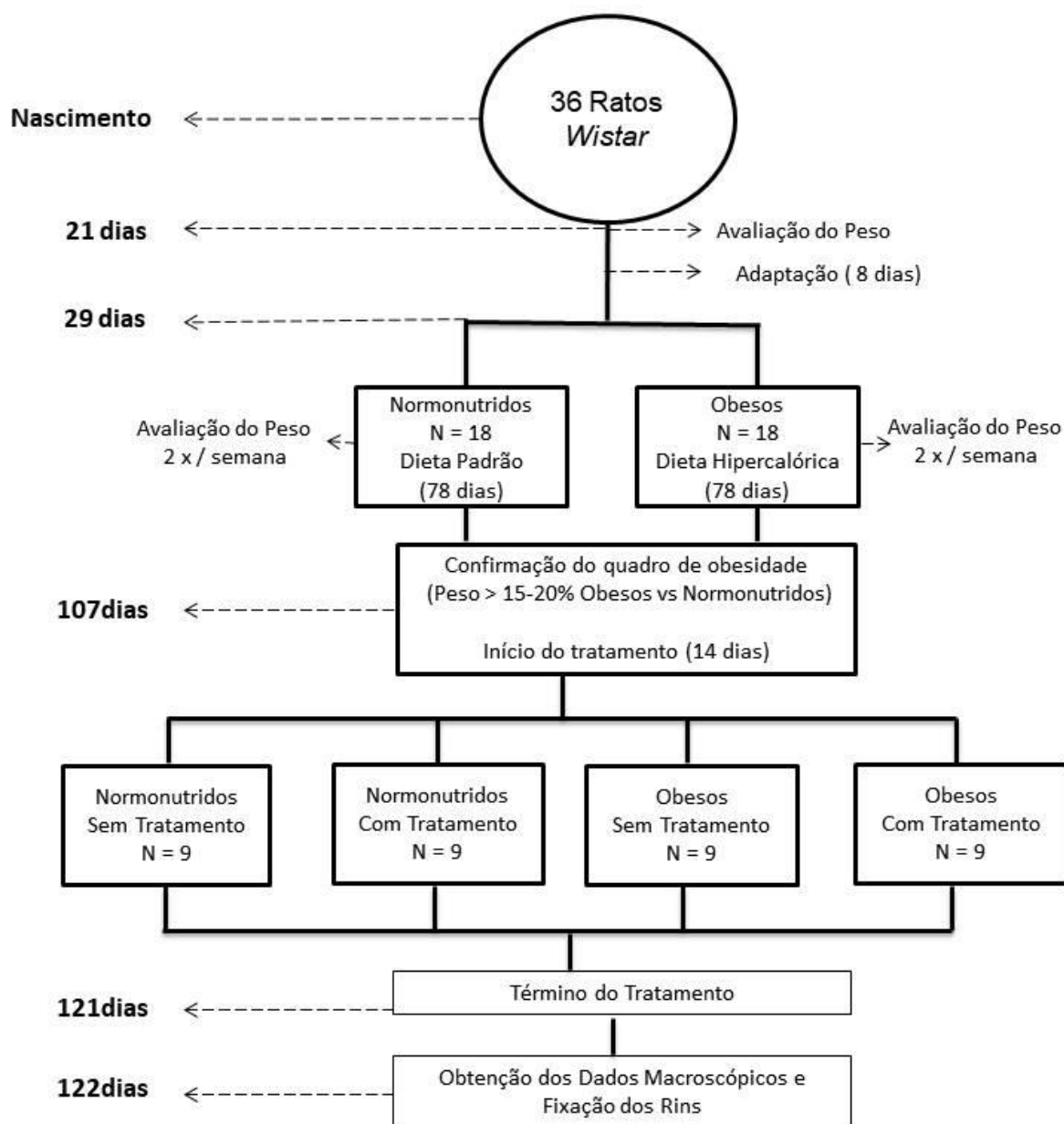
O tratamento para os quatros grupos foi realizado por 14 dias com aplicações diárias de injeção subcutânea no dorso no animal de acordo com a tabela 2:

Tabela 2 – Tratamento e dose aplicada nos quatros grupos.

Grupo	Tratamento	Dose
NST	solução salina	1mg/kg
NCT	naltrexona/bupropiona	1mg/20mg/kg
OST	solução salina	1mg/kg
OCT	naltrexona/bupropiona	1mg/20mg/kg

Fonte: Próprios autores. NCT = normonutridos com tratamento, NST = normonutridos sem tratamento, OCT = obesos com tratamento, OST = obesos sem tratamento.

Figura 1 - Fluxograma do protocolo de tratamento e divisão dos grupos.



Fonte: Arquivo do próprio autor.

5.6 COLETA, OBTENÇÃO DOS DADOS MACROSCÓPICOS E FIXAÇÃO DOS RINS

Aos 122º dia de vida, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas e previamente pesados e anestesiados com Isoflurano por via inalatória. Após confirmação da anestesia, foi realizada a perfusão transcardíaca nos animais, através de uma incisão na cavidade torácica e introdução de uma cânula acoplada a uma bomba peristáltica (Milan® BR-600, Colombo, Paraná-PR, Brasil) acionada em velocidade compatível para a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. A remoção do sangue de dentro dos vasos foi realizada

com a infusão 150ml de solução salina (NaCl, 0,9%) a temperatura ambiente e, posteriormente, da solução fixadora (4% de paraformaldeído em 4% de PBS, Ph 7,4, a 4°C). Os rins foram retirados e adicionados em potes identificados contendo solução de formol a 10% tamponado, pH 7,2. Os animais foram descartados seguindo as normas do COBEA (2015).

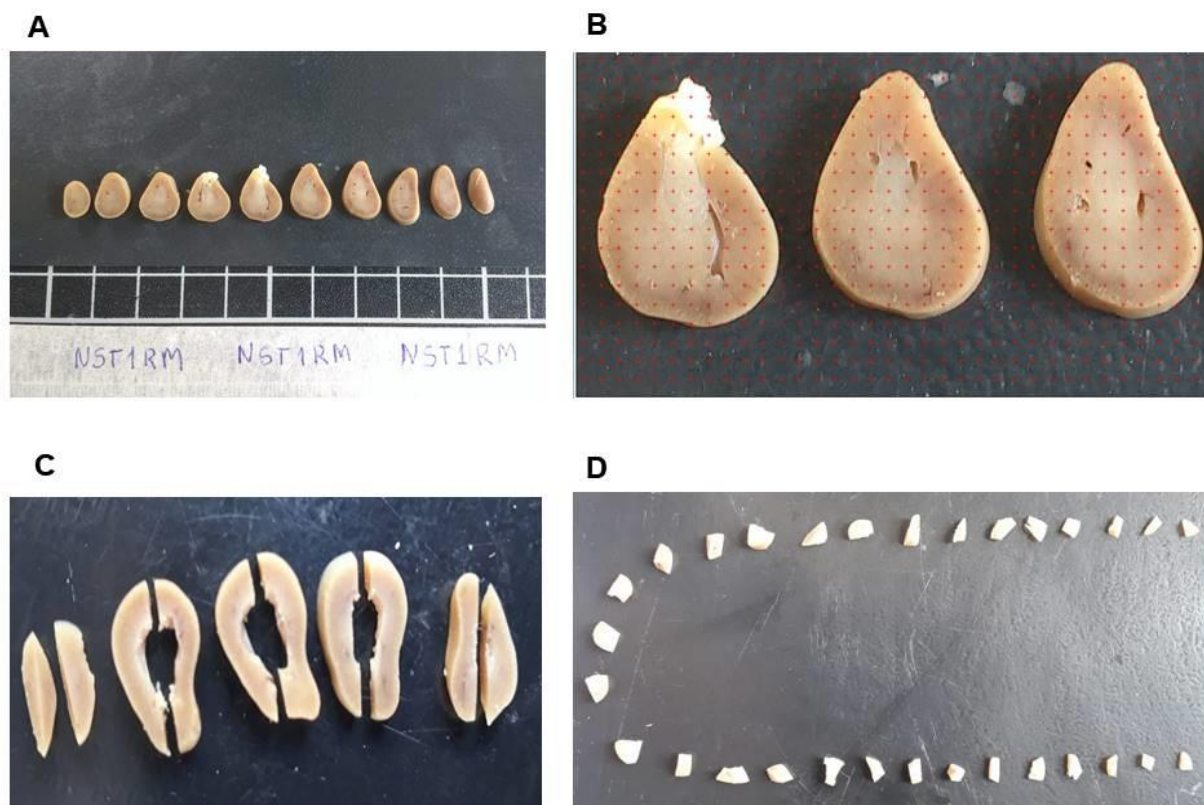
5.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA DOS RINS

Após a fixação em solução de formol a 10% por no mínimo 24h alguns parâmetros morfométricos foram analisados, o rim foi pesado, sendo utilizado para essa medida balança digital da marca Kmach® com capacidade máxima 700g e mínima 1g. O rim foi seccionado em vários cortes de 2mm cada (Figura 2 A). Após essa etapa foi aplicada uma fração de $\frac{1}{2}$ para seleção dos cortes a serem estudados. Em seguida os cortes processados foram fotografados e as fotos adicionadas ao programa imageJ (versão 1.3.4.67) para quantificação estereológica do volume do córtex e da medula, através do princípio de Cavalieri, que consiste em um sistema de teste quadrático para calcular áreas e volumes (Figura 2 B).

Esse Princípio foi empregado nos cortes macroscópicos, dispostos em fatias transversais utilizando-se a seguinte fórmula: $V = \sum P \times (a / p) \times t$. Onde, $\sum P$ corresponde ao somatório de pontos do sistema teste que tocam a estrutura desejada (área seccional de qualquer órgão), (a/p) é a área associada a cada ponto do sistema teste, e t é a espessura de cada fatia (GARAVELLO, 2013, GARCIA, 2017).

Em seguida cada fatia foi seccionada em seis fragmentos (Figura 2 C) e todos os fragmentos foram distribuídos em uma superfície plana do menor para o maior fragmento e deste para o menor novamente em formato de “U” (Figura 2 D), onde foi aplicado uma fração de $\frac{1}{3}$ e após foram selecionados os fragmentos que foram analisados.

Figura 2 – Processamento do material para análise.



Fonte: Próprios autores. Rins cortados em fatias de 2mm. A – Disposição das fatias de 2mm para fotografia; B – Aplicação do imageJ para análise estereológica. C – Início de fragmentação da amostra selecionada, D – Disposição dos fragmentos em “U” para amostragem.

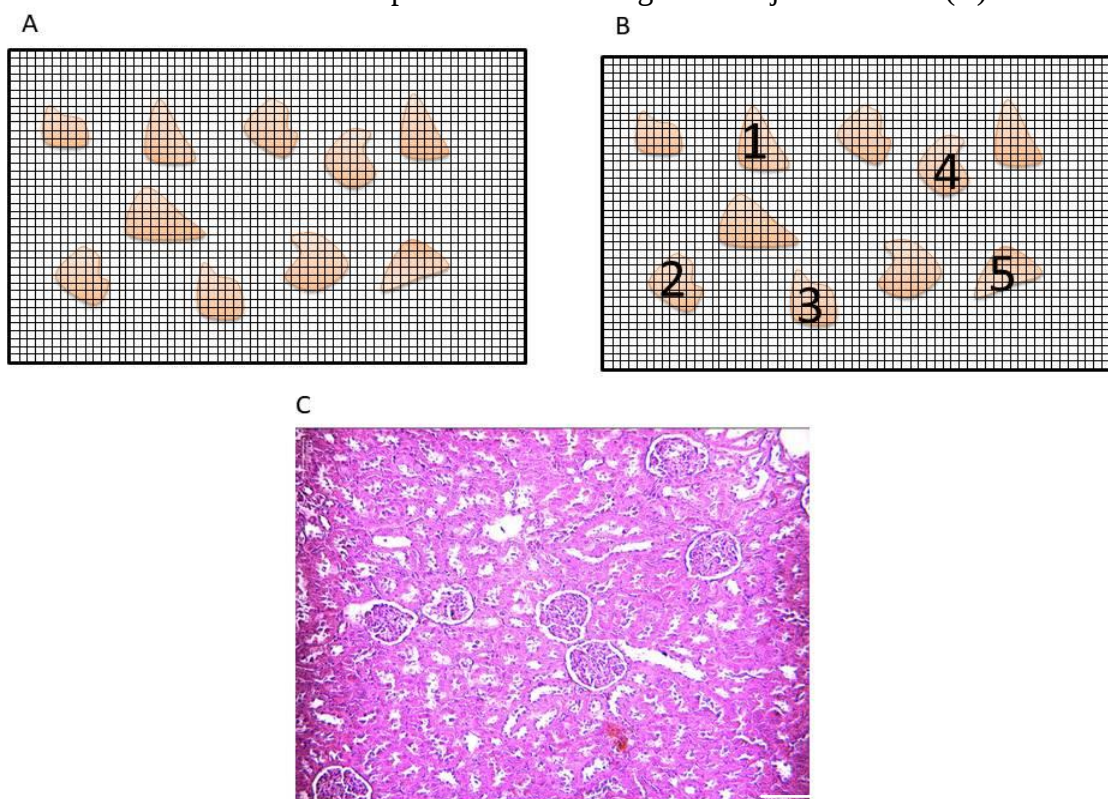
Em média de 10 a 12 fragmentos foram selecionados para serem inseridos nos cassetes histológicos e dispostos para processamento em um aparelho Histotécnico automatizado OMA (modelo CM 69), onde o material foi submetido a uma série de graduação de etanol a 70%, 85%, 95% e três sequências de etanol a 100%, por sessenta minutos, duas sequências de xilol por sessenta minutos em cada, e duas sequências de parafina aquecida a 56°C por sessenta minutos cada. Após este processo, o material foi emblocado em parafina.

Para a realização dos cortes na espessura de 5µm foi utilizado o micrótomo marca Leitz (modelo 1512). Todos os rins foram corados usando a técnica de hematoxilina-eosina para observação dos aspectos histomorfológicos do tecido. O preparo das lâminas obedeceu aos seguintes passos: os cortes foram desparafinizados em duas passagens pelo xilol (5 minutos cada), hidratados em duas passagens por álcool 100% (3 minutos cada), seguidos por álcool 90% (3 minutos), lavados em água por 5 minutos e corados por 2 minutos com hematoxilina de Harris. Em seguida foram lavados novamente com água corrente por 5 minutos e corados pela eosina por 1 minuto; na sequência desidratados na bateria de

desidratação por duas vezes (3 minutos cada), passando por sequência de álcool sendo 70%, 95%, 100%, após foram lavados com xilol 2 vezes de 3 minutos cada, secados e fixados com lamínula de vidro.

Após este procedimento, as amostras foram encaminhadas para a leitura histológica por um pesquisador experiente em patologia animal. Das lâminas de cada animal (Figura 3 A) foram selecionados cinco campos (Figura 3 B) através de uma randomização para serem fotografados pela câmera (Moticam 1000 1.3 MP) acoplada ao microscópio da marca Labomed por meio de um software Motic Image Plus 2.0, disponível no Laboratório de Microscopia do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco. Cada campo estava sobreposto a uma grade transparente com quadrados de 1mm^2 . Através de uma nova randomização foram selecionados dois quadrados por cada campo, sendo fotografados na objetiva de 10x através do software Motic Image Plus 2.0 (Figura 3 C). No total foram analisadas 360 fotos, 10 fotos de cada animal, dos 180 campos selecionados.

Figura 3 – Ilustração do esquema de randomização para fotografia (A e B) e campo selecionado para análise da imagem na objetiva de 10x (C).

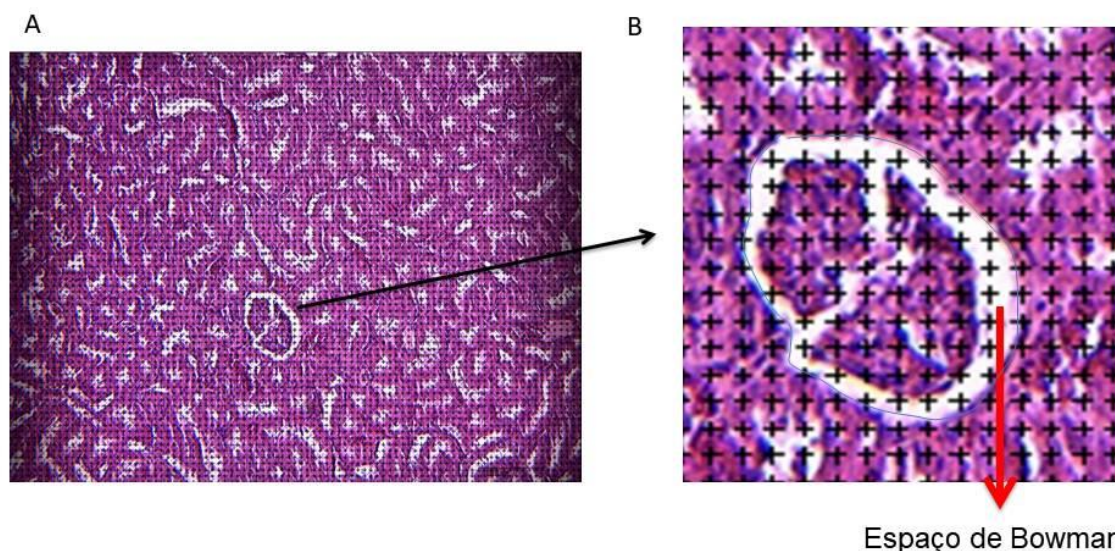


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Através de parâmetros morfométricos foram quantificadas a área do espaço capsular e a área dos glomérulos. Das lâminas de cada animal foram realizadas fotomicrografias de cinco campos como descrito anteriormente. No total foram fotomicrografados 45 campos de cada grupo.

Para a mensuração da área do espaço capsular utilizou-se o programa ImageJ (versão 1.3.4.67) que possibilita uma distribuição uniforme de pontos na estrutura estudada, ou seja, através da contagem dos pontos que tocam a estrutura tornou-se possível a verificação da área, neste caso em μm^2 (figura 4).

Figura 4 – Distribuição de pontos para o cálculo da área do espaço capsular.



Fonte: Arquivo pessoal do autor. Corte de rim em objetiva de 10x, corado por hematoxilina-eosina demonstrando a capsula glomerular de animal normonutrido, utilizada no image J para calculo de área do espaço glomerular, utilizando calculo da contagem de pontos que tocam a estrutura.

O mesmo programa foi utilizado para a verificação da área dos glomérulos fazendo uso da mesma ferramenta. No caso da quantificação numérica dos glomérulos normais e atróficos foi realizada através da observação da imagem.

Foi verificado por meio dos parâmetros estereológicos a Densidade de Volume (Vv) dos glomérulos. Assim, determinou-se a ocupação relativa da área-teste pela área de imagens da estrutura estudada já que a lei básica da estereologia é de que a quantidade relativa de pontos que tocam a estrutura é comparável a quantidade de volume desta estrutura na área-teste (Princípio de Delesse). A Densidade de Volume (Vv) foi calculada de acordo com a

fórmula: $Vv[estrutura] = \frac{P[estrutura]}{P_T}$, em que $P[estrutura]$ é o número de pontos que cruzam a estrutura testada e P_T o número total de pontos-teste do sistema-teste (LACERDA, 2000).

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram registrados em planilhas do Excel, sendo descritos como média e desvio padrão para as variáveis contínuas. Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-wilk para analisar a distribuição das variáveis. Para verificar diferenças nos valores médios entre os grupos, foi utilizado o teste estatístico Kruskal wallis para análise das variáveis não paramétricas e o one-way (ANOVA) para as paramétricas. Para processamento de dados, foi utilizado o programa estatístico IBM SPSS Statistic Base versão 22.0. Os resultados foram considerados significantes com $p < 0.05$.

6 EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO NALTREXONA/BUPROPIONA EM RINS DE RATOS OBESOS: UMA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA.

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura e está associada a riscos elevados de câncer de mama, colo, reto, rim e outros tipos. Além de apresentar-se como fator de risco para doenças crônicas como diabetes tipo 2 e doenças cardíacas. Sua etiologia é multifatorial, acredita-se que a consequência de alterações nos padrões alimentares e de atividade física, causados por mudanças nos ambientes econômicos, sociais e físicos ocasione o surgimento de níveis elevados de gordura corporal [1,2,3].

O indivíduo obeso apresenta potente fator de risco para desenvolvimento de doença renal. Neles ocorre uma hiperfiltração compensatória para atender às maiores demandas metabólicas do aumento do peso corporal. O aumento da pressão intraglomerular pode danificar os rins e aumentar o risco de desenvolver doença renal crônica. A incidência de glomerulopatia relacionada à obesidade aumentou dez vezes nos últimos anos [4].

Para o tratamento da obesidade tem sido utilizado as cirurgias bariátricas, tratamentos dietéticos, terapias cognitivas-comportamental e a utilização de alguns fármacos [5]. Várias são as opções de medicamentos, que vão desde psicoestimulantes a antidepressivos e antagonistas opioides. A associação desses dois últimos foi liberada para tratamento da obesidade pelo FDA (*Foods and Drugs Association* – Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos) em 2014, com o nome comercial de Contrave®. A associação naltrexona/bupropiona é uma combinação de naltrexona, um antagonista opioides e de bupropiona, um antidepressivo da classe da aminocetona, um inibidor do neurônio de receptação de dopamina e noraepinefrina [6,7]. Essa combinação utilizada com objetivo anoréxico, foi associada a resultados positivos em detrimento a utilização dessas drogas separadamente no tratamento contra a obesidade [8, 9,10,11].

Sabendo que os rins são alvos de diversas drogas usadas em doenças metabólicas como a obesidade [12], torna-se importante o conhecimento da ação do Contrave® sobre este órgão. Na literatura atual pouco se sabe sobre o efeito dessa associação naltrexona/bupropiona no aspecto histomorfométrico dos rins de animais obesos. Desta forma, faz-se necessário a investigação, com o intuito de estabelecer informações a respeito dos efeitos dessa combinação sobre os rins, sabendo que a obesidade é um fator de risco para nefropatias.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

O uso dos animais do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA/CCB/UFPE) através do processo: 23076.053208/2014-57, de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO E DA AMOSTRA.

Estudo do tipo experimental em ratos da linhagem Wistar. Realizado nos laboratórios de Histotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências Médicas da UFPE, no período de agosto de 2017 a julho de 2019.

Após os 21 dias de vida, os animais foram divididos em dois grupos: 18 com alimentação normal (normonutridos) e 18 com alimentação hipercalórica para provocar a obesidade.

Os animais normonutridos tiveram acesso à dieta balanceada padrão para roedores do biotério da marca Presence®, composta de: farelo de milho, farelo de trigo, farelo de soja, carbonato de cálcio, fosfato, bicálcico, cloreto de sódio, aminoácido e premix mineral vitamínico. Possui em média 24,3g% de proteína, 56,0g% de carboidrato, 3,2g% de lipídios e 5,0g% de fibras com fornecimento calórico de 3,3 kcal/g.

Os animais que tiveram acesso a dieta hipercalórica ocidentalizada receberam uma mistura da ração comercial Presence® junto a alimentos hipercalóricos: maisena, biscoito maisena de chocolate, farinha de soja, caseína, celulose, óleo de milho, óleo de soja, banha sadia, manteiga, margarina, creme de leite, açúcar, sais – mix mineral, vitaminas, colina, metionina, BHT, NaCl e glutamato monossódico.

A dieta ocidentalizada foi preparada no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos da Universidade Federal de Pernambuco (LEAAL/UFPE) com base nas informações fornecidas pelo fabricante dos ingredientes da dieta Ocidentalizada para crescimento/manutenção (Rhoster indústria e Comércio) e da dieta padrão de biotério (Presence® Ratos e Camundongos - Purina do Brasil S/A). Produzida para as fases de crescimento e manutenção do rato com uso de acordo com a idade do animal, apresentando

variações nos componentes palatáveis para cada uma delas, mas com preservação dos teores nutricionais. As versões da dieta ocidentalizada, crescimento e manutenção foram baseadas em estudos anteriores Cavalcante et al. (2013). Na fase de crescimento, esta teve seus valores de proteínas em torno de 18g%, lipídios 17g%, carboidratos 44g% e fibras 5,2% com fornecimento médio de 4,0Kcal/g; A dieta de manutenção situou-se em torno de 14% de proteínas, 18% de lipídios e 47% de carboidratos e 5,2% de fibras com fornecimento médio de 4,0Kcal/g.

O peso corporal dos animais foi verificado no 21º dia pós-natal (desmame) e logo após o período de adaptação ambiental 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.

Após 78 dias de dieta, já estabelecido o quadro de obesidade (animais entre 15-20% a mais de peso do que os animais controles normonutridos). Os ratos foram divididos em quatro grupos (n = 9 animais por grupo), dando-se início ao tratamento farmacológico. As doses terapêuticas de segurança utilizadas para o tratamento antiobesidade pela associação Naltrexona/bupropiona foram de 1mg/20mg/kg (Sigma-Aldrich®; Toronto Research Chemicals, North York, ON) uma vez ao dia [13].

2.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO E OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIENTAIS

O tratamento para os quatros grupos foi realizado por 14 dias com aplicações diárias de injeção subcutânea no dorso no animal de acordo com a tabela 1:

Tabela 1 – Tratamento e dose aplicada nos quatros grupos.

Grupo	Tratamento	Dose
NST	solução salina	1mg/kg
NCT	naltrexona/bupropiona	1mg/20mg/kg
OST	solução salina	1mg/kg
OCT	naltrexona/bupropiona	1mg/20mg/kg

Fonte: Elaboração dos autores. NCT = normonutridos com tratamento, NST = normonutridos sem tratamento, OCT = obesos com tratamento, OST = obesos sem tratamento.

2.4 COLETA, OBTENÇÃO DOS DADOS MACROSCÓPICOS E FIXAÇÃO DOS RINS

Aos 122º dias de vida, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas e previamente pesados e anestesiados com Isoflurano por via inalatória. Após confirmação da anestesia, foi realizada a perfusão transcardíaca nos animais, através de uma incisão na cavidade torácica e introdução de uma cânula acoplada a uma bomba peristáltica (Milan® BR-600, Colombo, Paraná-PR, Brasil) acionada em velocidade compatível para a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. A remoção do sangue de dentro dos vasos foi realizada com a infusão 150ml de solução salina (NaCl, 0,9%) a temperatura ambiente e, posteriormente, da solução fixadora (4% de paraformaldeído em 4% de PBS, Ph 7,4, a 4°C). Os rins foram retirados e adicionados em potes identificados contendo solução de formol 10% tamponado, pH 7,2. Os animais foram descartados seguindo as normas do COBEA (2015).

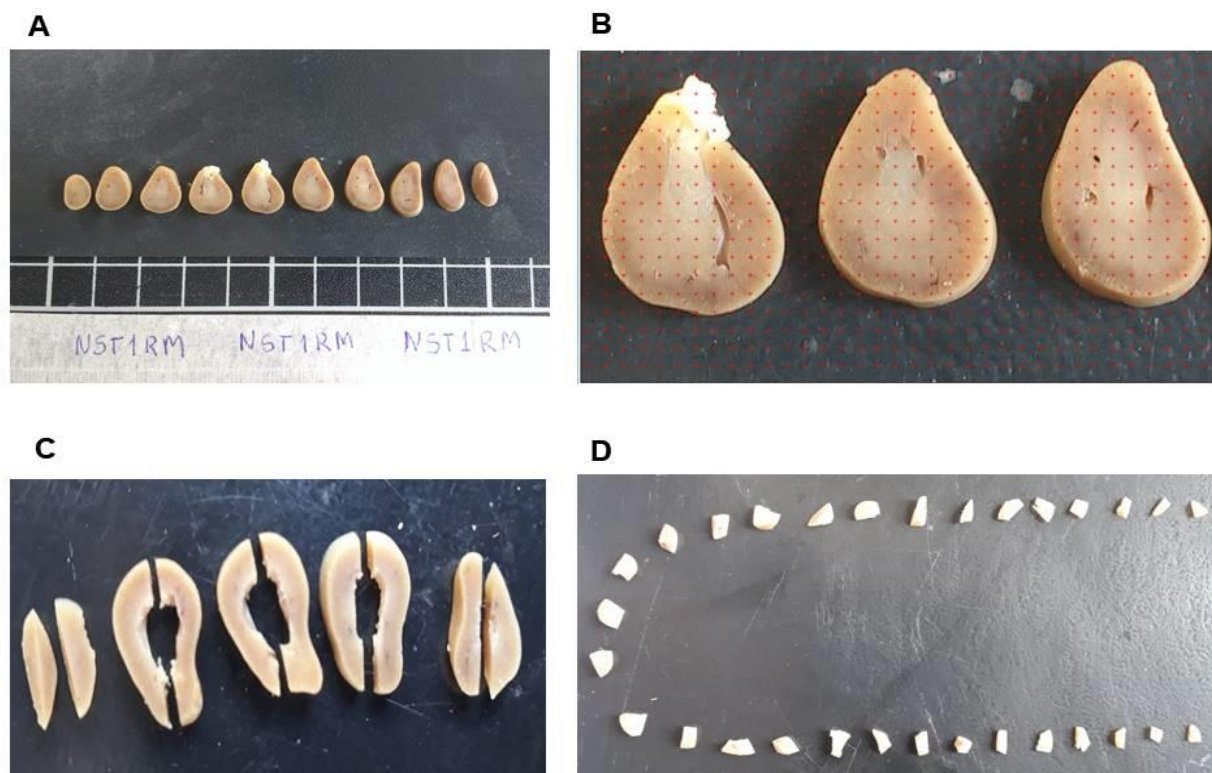
2.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA DOS RINS

Após a fixação em solução de formol a 10% por 24h alguns parâmetros morfométricos foram analisados, o rim foi pesado, sendo utilizado para essa medida balança digital da marca Kmach® com capacidade máxima 700g e mínima 1g. O rim foi seccionado em várias fatias de 2mm cada (Figura 1 A). Após essa etapa foi aplicada uma fração de $\frac{1}{2}$ para seleção das fatias a serem estudadas. Em seguida as fatias selecionadas foram fotografadas e as fotos adicionadas ao programa imageJ (versão 1.3.4.67) para quantificação estereológica do volume do córtex e da medula, através do princípio de Cavalieri, que consiste em um sistema de teste quadrático para calcular áreas e volumes (Figura 1 B).

Esse Princípio foi empregado nos cortes macroscópicos, dispostos em fatias transversais utilizando-se a seguinte fórmula: $V = \sum P \times (a / p) \times t$. Onde, $\sum P$ corresponde ao somatório de pontos do sistema teste que tocam a estrutura desejada (área seccional de qualquer órgão), (a/p) é a área associada a cada ponto do sistema teste, e t é a espessura de cada fatia [14,15].

Em seguida cada fatia foi seccionada em seis fragmentos (Figura 1 C) e todos os fragmentos foram distribuídos em uma superfície plana do menor para o maior fragmento e deste para o menor novamente em formato de “U” (Figura 1 D), onde foi aplicado uma fração de $\frac{1}{3}$ e após foram selecionados os fragmentos que foram analisados.

Figura 1 – Processamento do material para análise.



Fonte: Arquivo pessoal dos autores. Rins cortados em fatias de 2mm. A – Disposição das fatias de 2mm para fotografia; B – Aplicação do imageJ para análise estereológica. C – Início de fragmentação da amostra selecionada, D – Disposição dos fragmentos em “U” para amostragem.

Em média de 10 a 12 fragmentos foram amostrados para serem inseridos nos cassetes histológicos e dispostos para processamento em um aparelho Histotécnico automatizado OMA (modelo CM 69), onde o material foi submetido a uma série de graduação de etanol a 70%, 85%, 95% e três sequências de etanol a 100%, por sessenta minutos, duas sequências de xilol por sessenta minutos em cada, e duas sequências de parafina aquecida a 56°C por sessenta minutos cada. Após este processo, o material foi emblocado em parafina.

Para a realização dos cortes na espessura de 5µm foi utilizado o micrótomo marca Leitz (modelo 1512). Todos os rins foram corados usando a técnica de hematoxilina-eosina para observação dos aspectos histomorfológicos do tecido. O preparo das lâminas obedeceu aos seguintes passos: os cortes foram desparafinizados em duas passagens pelo xilol (5 minutos cada), hidratados em duas passagens por álcool 100% (3 minutos cada), seguidos por álcool 90% (3 minutos), lavados em água por 5 minutos e corados por 2 minutos com hematoxilina de Harris. Em seguida foram lavados novamente com água corrente por 5 minutos e corados pela eosina por 1 minuto; na sequência desidratados na bateria de

desidratação por duas vezes (3 minutos cada), passando por sequência de álcool sendo 70%, 95%, 100%, após foram lavados com xilol 2 vezes de 3 minutos cada, secados e fixados com lamínula de vidro.

Após este procedimento, as amostras foram encaminhadas para a leitura histológica por um pesquisador experiente em patologia animal.

Das lâminas de cada animal foram selecionados cinco campos através de uma randomização para serem fotografados pela câmera (Moticam 1000 1.3 MP) acoplada ao microscópio da marca Labomed por meio de um *software* Motic Image Plus 2.0, disponível no Laboratório de Microscopia do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco. Cada campo estava sobreposto a uma grade transparente com quadrados de 1mm². Através de uma nova randomização foram selecionados dois quadrados por cada campo, sendo fotografados na objetiva de 10x através do *software* Motic Image Plus 2.0. No total foram analisadas 360 fotos, 10 fotos de cada animal, dos 180 campos selecionados.

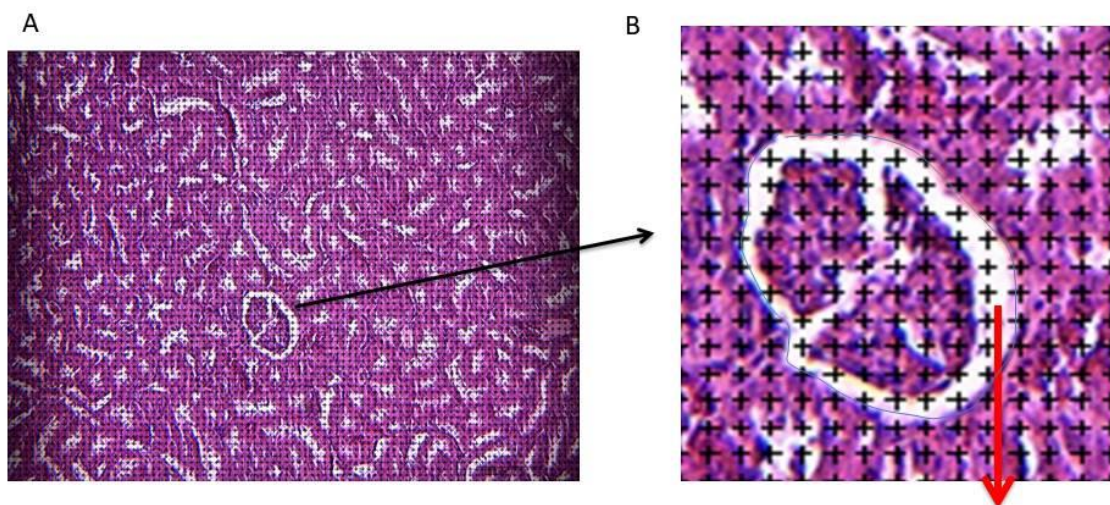
Através de parâmetros morfométricos foram quantificadas a área do espaço urinário e a área dos glomérulos. Das lâminas de cada animal foram realizadas fotomicrografias de cinco campos como descrito anteriormente. No total foram fotomicrografados 45 campos de cada grupo.

Para a mensuração da área do espaço capsular utilizou-se o programa ImageJ (versão 1.3.4.67) que possibilita uma distribuição uniforme de pontos na estrutura estudada, ou seja, através da contagem dos pontos que tocam a estrutura tornou-se possível a verificação da área, neste caso em μm^2 (Figura 2).

O mesmo programa foi utilizado para a verificação da área dos glomérulos fazendo uso da mesma ferramenta. No caso da quantificação numérica dos glomérulos normais e atróficos foi realizada através da observação da imagem.

Foi verificado por meio dos parâmetros estereológicos a Densidade de Volume (Vv) dos glomérulos. Assim, determinou-se a ocupação relativa da área-teste pela área de imagens da estrutura estudada já que a lei básica da estereologia é de que a quantidade relativa de pontos que tocam a estrutura é comparável a quantidade de volume desta estrutura na área-teste (Princípio de Delesse). A Densidade de Volume (Vv) foi calculada de acordo com a fórmula: $Vv[\text{estrutura}] = \frac{P[\text{estrutura}]}{P_T}$, em que P[estrutura] é o número de pontos que cruzam a estrutura testada e P_T o número total de pontos-teste do sistema-teste [16].

Figura 2 – Distribuição de pontos para o cálculo da área do espaço capsular.



Fonte: Arquivo pessoal dos autores. Corte de rim em objetiva de 10x, corado por hematoxilina-eosina demonstrando a capsula glomerular de animal normonutrido, utilizada no image J para calculo de área do espaço glomerular, utilizando calculo da contagem de pontos que tocam a estrutura.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram registrados em planilhas do Excel, sendo descritos como média e desvio padrão para as variáveis contínuas. Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-wilk para analisar a distribuição das variáveis. Para verificar diferenças nos valores médios entre os grupos, foi utilizado o teste estatístico Kruskal wallis para análise das variáveis não paramétricas e o one-way (ANOVA) para as paramétricas. Para processamento de dados, foi utilizado o programa estatístico IBM SPSS Statistic Base versão 22.0. Os resultados foram considerados significantes com $p < 0.05$.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

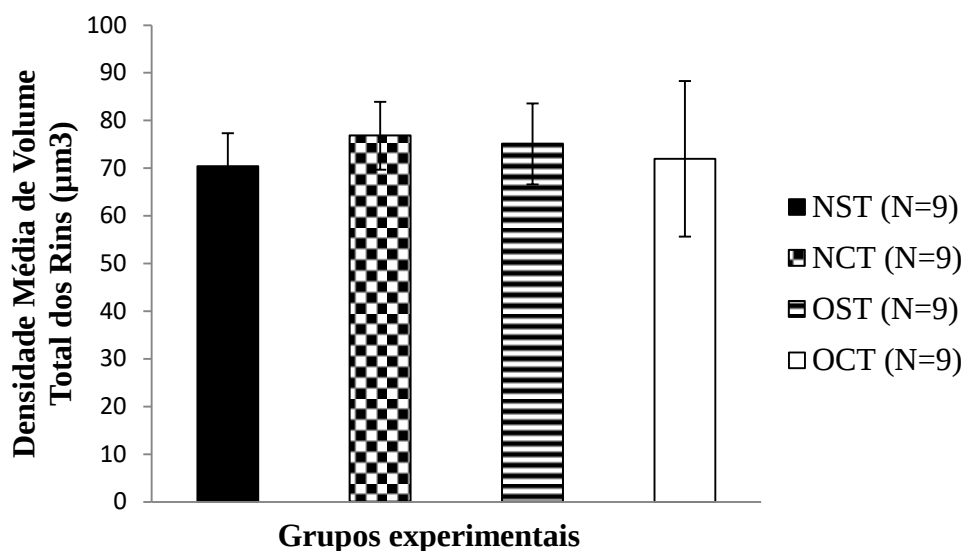
O comprimento e o peso médios dos rins dos quatro grupos são apresentados na tabela 2. Observou-se que os dois grupos de ratos obesos apresentaram um menor peso relativo do rim quando comparado ao grupo NST.

Tabela 2 – Comprimento (cm) e peso relativo renal (g/g) de ratos Wistar.

Parâmetros	GRUPOS				VALOR DE P
Avaliados	NST (N=9)	NCT (N=9)	OST (N=9)	OCT (N=9)	
Comprimento (cm)	2,04± 0,05	2,08± 0,09	2,07± 0,07	2,04± 0,15	0,752
Peso Relativo (g/g)	0,39± 0,03	0,37± 0,04	0,33± 0,03*	0,32± 0,05*	0,001

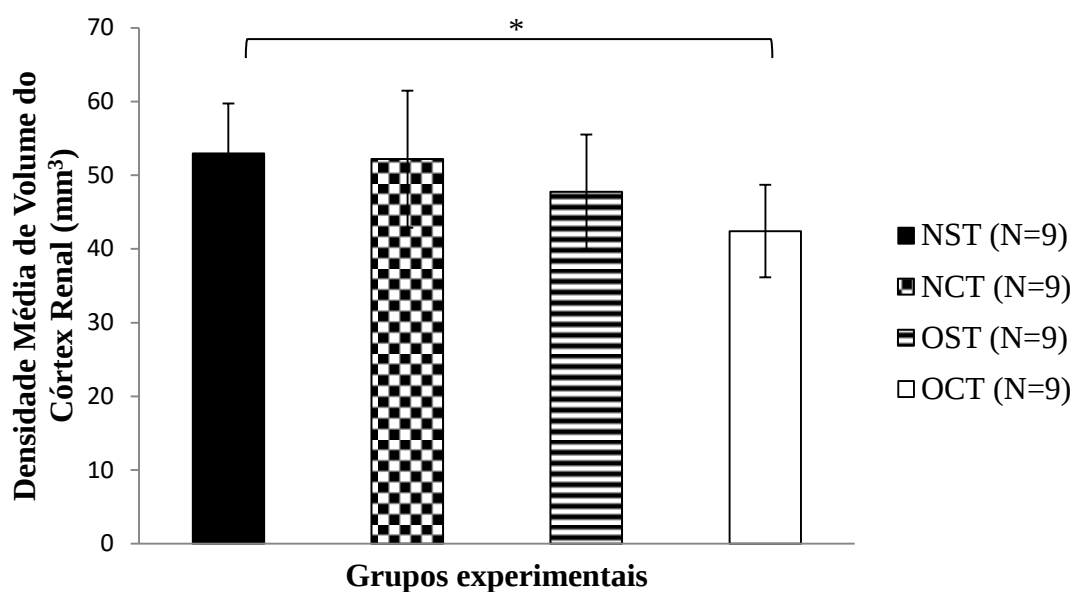
Dados apresentados em média±desvio-padrão. NST = Normonutrido sem tratamento, NCT = Normonutrido com tratamento, OST = Obeso sem tratamento, OCT = Obeso com tratamento. *p < 0,05, comparação com o grupo NST.

As médias dos volumes total, do córtex renal e medular dos quatros grupos de ratos são apresentadas nas figuras 3, 4 e 5, respectivamente. Nas quais é possível observar que houve uma redução do volume do córtex renal e um aumento do volume medular no grupo OCT quando comparado ao grupo de ratos normonutridos que não foram submetidos ao tratamento.

Figura 3 – Volume total dos rins (μm^3) em ratos Wistar.

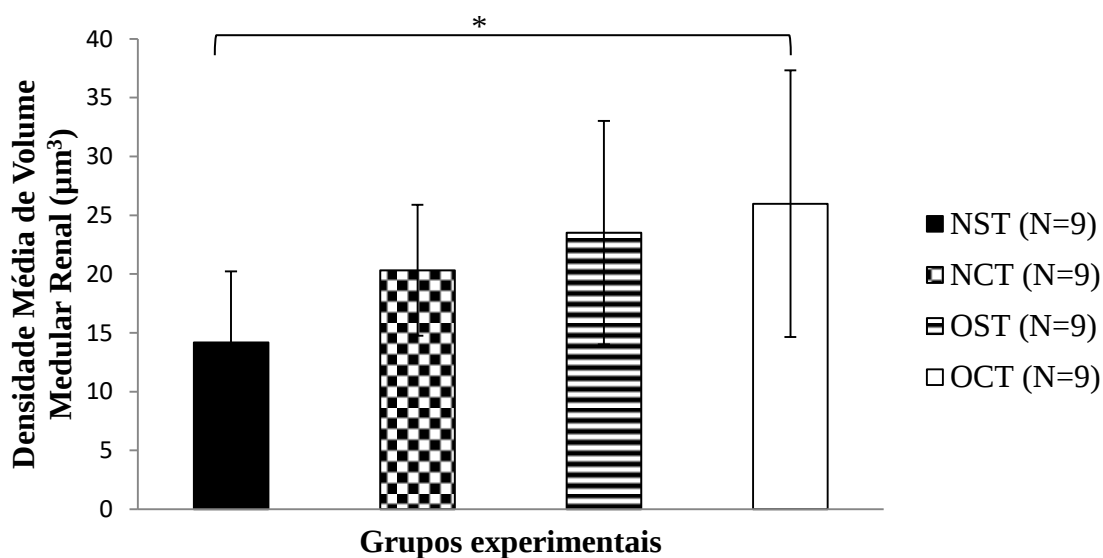
Os valores estão representados por média e desvio-padrão. NST = Normonutrido sem tratamento, NCT = Normonutrido com tratamento, OST = Obeso sem tratamento, OCT = Obeso com tratamento.

Figura 4 – Volume do córtex renal (μm^3) em ratos *Wistar*.



Os valores estão representados por média e desvio-padrão. * Significância obtida a partir do teste one-way ANOVA ($p < 0,05$), comparação do grupo normonutrido sem tratamento vs obeso com tratamento. NST = Normonutrido sem tratamento, NCT = Normonutrido com tratamento, OST = Obeso sem tratamento, OCT = Obeso com tratamento.

Figura 5 – Volume medular (μm^3) em ratos *Wistar*.



Os valores estão representados por média e desvio-padrão. * Significância obtida a partir do teste one-way ANOVA ($p < 0,05$), comparação do grupo normonutrido sem tratamento vs obeso com tratamento. NST = Normonutrido sem tratamento, NCT = Normonutrido com tratamento, OST = Obeso sem tratamento, OCT = Obeso com tratamento.

3.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA.

Na análise microscópica dos grupos estudados foram observados o número de glomérulos normais e atroficos, o espaço urinário e a densidade glomerular. Os dados da média ($\pm$ DP) estão demonstrados na tabela 3. Não houve diferença significativa em nenhuma das comparações realizadas entre os grupos.

Tabela 3 –Número de glomérulos (unidade), número de glomérulos atroficos (unidade), espaço urinário (μm^2) e densidade glomerular (μm^3), em ratos *Wistar*.

Parâmetros Avaliados	GRUPOS				VALOR DE P
	NST (N=9)	NCT (N=9)	OST (N=9)	OCT (N=9)	
Nº de Glomérulos	2,87 $\pm$ 0,58	3,39 $\pm$ 0,99	3,42 $\pm$ 1,41	4,22 $\pm$ 0,94	0,079
Nº de Glomérulos Atróficos	0,21 $\pm$ 0,14	0,17 $\pm$ 0,23	0,21 $\pm$ 0,20	0,27 $\pm$ 0,23	0,738
Espaço Urinário (μm^2)	42,07 $\pm$ 15,35	45,71 $\pm$ 25,49	42,93 $\pm$ 16,22	38,03 $\pm$ 16,40	0,915
Vv GLOM (μm^3)	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,116

Os valores estão representados por média e desvio-padrão. NST = Normonutrido sem tratamento, NCT = Normonutrido com tratamento, OST = Obeso sem tratamento, OCT = Obeso com tratamento, Vv GLOM = Densidade de volume glomerular.

4 DISCUSSÃO

A obesidade traz consigo uma série de comorbidades dentre elas a hipertensão arterial e a diabetes, consideradas fator de risco importante para a DRC (Doença Renal Crônica) [17,18]. Algumas drogas têm contribuído para tratar essa patologia, a associação Naltrexona/Bupropiona tem se apresentado eficaz se tornando alvo de muitos estudos [9,10,11].

Nesse estudo foi observado que os animais obesos apresentaram uma diminuição significativa do peso relativo renal em comparação com os animais do grupo NST. Fato que pode ser justificado tendo em vista que o aumento do tecido adiposo não interfere no tamanho do tecido renal. Desta forma ratos obesos apresentam um rim relativamente menor que os normonutridos. Estudos mostram que a diminuição do peso relativo contribui para a sobrecarga renal devido ao aumento do volume circulante assim associando a danos renais a longo prazo [4,19,20].

O volume total do rim dos animais não mostrou alteração significativa quando comparado entre os grupos. No entanto quando avaliados separados o volume de córtex e o volume de medula do grupo OCT, observamos uma diminuição do volume do córtex e

aumento da medula renal em relação ao grupo NST, sugerindo alguma alteração das estruturas renais dos animais obesos tratados com a droga. Sabe-se que no córtex renal encontramos maior quantidade de glomérulos quando comparado à região medular do rim [21]. No entanto na análise microscópica não foi evidenciado diferença na quantidade de glomérulos dos grupos estudados. Desta forma o aumento do volume medular parece não estar relacionado à diminuição glomerular e pode ser associado a dilatação tubular, sendo necessários mais estudos direcionados a essa hipótese.

O estudo morfométrico e estereológico não evidenciou diferenças significativas relacionadas ao número de glomérulos normais e atróficos, espaço urinário e densidade glomerular em nenhum dos grupos avaliados, divergindo do estudo de Altunkaynak (2008) que avaliou animais normonutridos e obesos mediante metodologia semelhante, por um período de três meses, e encontrou aumento no volume total dos rins, do córtex, da medula, na quantidade de glomérulos normais e um aumento do espaço urinário nos animais obesos em comparação com os normonutridos [22].

Durante a análise microscópica das lamínas, realizada por um patologista experiente em patologia animal, não foi encontrado quaisquer alterações patológicas nos grupos estudados divergindo de estudos que encontraram alterações patológicas em rins de obesos [22,23]. Laurientius (2019) em seu estudo com ratos obesos e normonutridos encontrou alterações como glomerulosclerose, dano tubular, superabundância de macrófagos e marcadores inflamatórios que em longo prazo podem sensibilizar o rim para a DRC progressiva [23]. Outro estudo realizado por oito semanas com dieta hipercalórica, verificou que o espaço urinário diminuiu no grupo dos obesos comparados aos animais normonutridos, evidenciando alterações morfológicas sem afetar os níveis sanguíneos de ureia e creatinina, contribuindo para induzir ou aceleração progressão de uma doença renal [15].

Durante a pesquisa foi observado escassez de estudos relacionando o uso de naltrexona/bupropiona em obesos que possam evidenciar possíveis danos ao organismo, assim como também quando associando a pesquisa de naltrexona e bupropiona separadamente em relação ao rim, no entanto a bula dessa associação traz algumas restrições de uso como no caso de pacientes com doenças renais [24].

5 CONCLUSÕES

A associação naltrexona/bupropiona promoveu um aumento significativo medular e diminuição do córtex dos animais obesos quando comparados ao grupo normonutrido não tratado, embora não tenham sido evidenciadas quaisquer outras alterações em relação à histomorfometria renal, necessitando de mais estudos para essa análise.

Diante desse achado verificou-se que o uso de naltrexona/bupropiona em animais obesos aparentemente não traz malefícios as funções renais, uma vez estando preservada sua estrutura histomorfométrica. No entanto estudos complementares fazem-se necessário aumentando o tempo de uso da droga bem como análises detalhadas da histologia renal.

6 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento deste estudo (APQ 0729-4.01/15), ao Laboratório de Doenças Carentiais e Metabólicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas de Pernambuco, ao laboratório de Histotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Patologia (POSPAT).

7 REFERÊNCIAS

1. STURM, Roland., AN, Roupeng., Obesity and Economic Environments, **CA Cancer J Clin**, v. 64, n. 5, p. 337–350, 2014.
2. N. A. Miguel. “Effects of resveratrol on liver function of obese Wistar rats”, Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2014.
3. WHO - World Health Organization. Obesity and overweight, Fact sheet N°311, 2018.
4. KOVESDY, Csaba P. et al. Obesity and Kidney Disease: Hidden Consequences of the Epidemic. **Rev Med Chile**, v. 145, p. 281-291, 2017.
5. ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade**. 4.ed. - São Paulo, 2016.
6. CHRISTOU, Georgios A., KIORTSIS, Dimitrios N., The efficacy and safety of the naltrexone/bupropion combination for the treatment of obesity: an update; **Hormones**, 2015, v.14, n. 3, p. 370-375

7. IGEL, Leon I. et al., Practical Use of Pharmacotherapy for Obesity, **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1765-1779, 2017.
8. WRIGHT, F. L., RODGERS, Robert John. Acute behavioural effects of bupropion and naltrexone, alone and in combination, in non-deprived male rats presented with palatable mash. **Psychopharmacology**, v. 228, p. 291-307, 2013.
9. GREENWAY, Frank L. 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**, v. 376, p.595-605, 2010.
10. WADDEN, Thomas A. 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.
11. CLAPPER, Jason R. et al., Effects of amylin and bupropion/naltrexone on food intake and body weight are interactive in rodents models. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 698, p. 292-298, 2013.
12. VICENT, John., Drugs and the Kidneys: Clinical Pharmacology Perspectives. **Clinica Pharmacology & Therapeutics**. v. 102, n. 3, p. 368-372, September, 2017.
13. WRIGHT, F. L., RODGERS, Robert John. Acute behavioural effects of bupropion and naltrexone, alone and in combination, in non-deprived male rats presented with palatable mash. **Psychopharmacology**, v. 228, p. 291-307, 2013.
14. GARAVELLO, G. P. Cálculo de volumes pelo Princípio de Cavalieri. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do ABC. 2013.
15. GARCIA, Israel J. P. et al., Effects of high fat diet on kidney lipid content and the Na,K-ATPase activity. **Braz. J. Pharm. Sci.** v. 54, n. 1, 2018.
16. LACERDA, Carlos A. M.. Fisiologia e fisiopatologia: Estereologia do rim: determinação do Vv, Nv e volume médio do glomérulo; **J Bras Nefrol**, v. 22, n. 2, p. 103-109, 2000.
17. WICKMAN, Christopher, KRAMER Holly. Obesity and Kidney Disease: Potential Mechanisms. **Semin. Nephrol.**, v.33, n. 1, p. 14-22, Jan 2013.
18. WEBSTER, Angela C. et al., Chronic kidney disease, **Lancet**, v. 389, p. 1238-52, March 25, 2017.
19. SILVA JR, Geraldo Bezerra et al., Obesidade e Doença Renal. **J Bras Nefrol**, v. 39, n. 1, p.65-69, 2017.
20. FERREIRA, Lara B D et Al., Efeito da sobreposição de um modelo de obesidade neuroendócrina experimental e hipertensão arterial sobre a pressão arterial, peso

- corporal e parâmetros metabólicos e renais de ratos. *J Bras Nefrol* , v. 33, n. 3, p. 338 – 344, 2011.
21. AL-SAMAWY, Eyhab R.M. Morphological and Histological study of the kidneys on the Albino rats. **Al-Anbar J. Vet. Sci.**, v. 5, n. 1, p.115-119,2012
22. ALTUNKAYNAK, Muhammed E et al., The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats, **J. Anat.** , v. 212, p. 845–852, 2008.
23. LAURENTIUS, Thea et al., High-fat diet-induced obesity causes an inflammatory microenvironment in the kidneys of aging Long-Evans rats. **Journal of Inflammation**, v. 16, n. 14, 2019.
24. CONTRAVE: naltrexone HCl and bupropion HCl. La Jolla, CA: Takeda Pharmaceuticals America, (2014). Bula de Remédio.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação naltrexona/bupropiona promoveu um aumento significativo do volume medular e diminuição do córtex dos animais obesos quando comparados ao grupo normonutrido, embora não tenham sido evidenciadas quaisquer outras alterações em relação à histomorfometria renal, necessitando de mais estudos para essa análise.

Diante desse achado verificou-se que o uso de naltrexona/bupropiona em animais obesos aparentemente não traz malefícios as funções renais, uma vez estando preservada sua estrutura histomorfométrica. No entanto estudos complementares fazem-se necessário aumentando o tempo de uso da droga bem como análises detalhadas da histologia renal.

REFERÊNCIAS

- ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade**. 4.ed. - São Paulo, 2016.
- ALBUQUERQUE, Lusyanny P. et al., Relação da obesidade com o comportamento alimentar e o estilo de vida de escolares brasileiros, **Nutrición clínica y Dietética Hospitalaria**, v. 36, n. 1, p. 17-23, 2016.
- ALTUNKAYNAK, Muhammed E et al., The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats, **J. Anat.** , v. 212, p. 845–852, 2018.
- AL-SAMAWY, Eyhab R.M. Morphological and Histological study of the kidneys on the Albino rats. **Al-Anbar J. Vet. Sci.**, v. 5, n. 1, p.115-11, 2012.
- ANTONELLI, Jodi A. et al., Use of the National Health and Nutrition Examination Survey to calculate the impact of obesity and diabetes on cost and prevalence of urolithiasis in 2030. **Eur Urol.**, p. 724–9, 2014.
- ARNOLD, Melina, et al, Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study, **Lancet Oncol.**, v.16, n.1, p.: 36–46, 2015.
- BAHIA, Luciana , ARAUJO, Denizar Vianna. Impacto econômico da obesidade no Brasil. **Revista HUPE**, n.1, p.13-17v.13, 2014.
- BAHIA, Luciana, et al., The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**, v.12, p. 440. 2012.
- BARBIERI, Aline F., MELLO, Rosângela A., As causas da obesidade: uma análise sob a perspectiva materialista histórica. **Revista da Faculdade de Educação Física da UNICAMP**, v. 10, n. 1, p. 133-153, 2012.
- BELLO, Nicholas T., Update on drug safety evaluation of naltrexone/bupropion for the treatment of obesity, **Expert Opnion on Drug Safety**, v. 18, n. 7, p. 549-552, 2019.
- BERTHOUD, Hans-Rudolf, KLEIN, Samuel, “Advances in Obesity: Causes, Consequences and Therapy”, **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1635-1637, 2017.

CARDINALI, Daniel P, HARDELAND, Rüdiger. Inflammaging, Metabolic Syndrome and Melatonin: A Call for Treatment Studies. **Neuroendocrinology**, v. 104, n. 4, p. 382-397, 2017.

CHOOI, Yu C., SING, Cherlyn., MAGKOS, Faidon. The epidemiology of obesity. **Metabolism**, v.92, p.6-10, 2019.

CHRISTOU, Georgios A., KIORTSIS, Dimitrios N., The efficacy and safety of the naltrexone/bupropion combination for the treatment of obesity: an update; **Hormones**, v.14, n. 3, p. 370-375, 2015.

CONTRAVE: naltrexone HCl and bupropion HCl. La Jolla, CA: Takeda Pharmaceuticals America, (2014). Bula de Remédio.

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

CUI, Huxing et al., The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 338-351, 2017.

DIAS, Patrícia Camacho et al., Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro, **Cad. Saúde Pública**, v. 33, n. 37, p. 1-12, 2017.

DONG, Z et al., Comparative efficacy of five long-term weight loss drugs:quantitative information for medication guidelines, **Obesity Review**, v.18, n. 12, p. 1377-1385, 2017.

EATON, Douglas C., POOLER, John P. **Fisiologia Renal de Vander**. 8ª edição. Artmed Editora: Porto Alegre, 216p, 2015.

EDVARDSSON, Vidar O. et al., Temporal trends in the incidence of kidney stone disease, **Kidney Int.**, v. 83, p.146-52, 2013.

EZZATI, Majdi et al., Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults, **Lancet**, v. 390, p. 2627-42, 2017.

FERREIRA, Lara B D et Al., Efeito da sobreposição de um modelo de obesidade neuroendócrina experimental e hipertensão arterial sobre a pressão arterial, peso corporal e parâmetros metabólicos e renais de ratos. **J Bras Nefrol** , v. 33, n. 3, p. 338 – 344, 2011.

FERREIRA, Regicely A. B. , BENICIO, Maria, H. D., Obesidade em mulheres brasileiras: associação com paridade e nível socioeconômico, **Rev Panam Salud Publica**, v. 37, n. 4/5, p. 337-342, 2015.

GALMÉS, Sebastià et al, A Genetic Score of Predisposition to Low-Grade Inflammation Associated with Obesity May Contribute to Discern Population at Risk for Metabolic Syndrome, **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 298, 2019.

GARAVELLO, G. P. Cálculo de volumes pelo Princípio de Cavalieri. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do ABC. 2013.

GARCIA, Israel J. P. et al., Effects of high fat diet on kidney lipid content and the Na,K-ATPase activity. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 54, n. 1, 2018.

GARCÍA, Maria Teresa Fernandez et al. Aplicación práctica de métodos estereológicos renales em modelos animales experimentales. **Revista de la Sociedad Española de Nefrologia**, v. 37, n. 1, p. 29-33, 2017.

GAUTRON, Laurent, et al., Neural Control of Energy Balance: Translating Circuits to Therapies. **Cell**, v. 161, n.1, p.133–145, 2015.

GOBEL, Carl H, et al., Brain stimulation in obesity. **International Journal of Obesity**. 2017.

GOLDEN, Angela, Current pharmacotherapies for obesity: A practical perspective. **Journal of the American Association of Nurse Practitioners**, v. 29, p. 43–52, 2017.

GONZÁLEZ-MUNIESA, Pedro et al., Obesity, **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17034, 2017.

GRANT, Ryan W., DIXIT, Vishwa D, Adipose tissue as an immunological organ, **Obesity (Silver Spring)**, v. 23, n. 3, p. 512–8, 2015.

GREENWAY, Frank L. et al., Effect of naltrexone plus bupropion on weight loss in overweight and obese adults (COR-1): a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. **Lancet**, v. 376, p.595-605, 2010.

GUERDJIKOVA, Anna I. Et al., Concurrent improvement in both binge eating and depressive symptoms with naltrexone/bupropion therapy in overweight or obese subjects with

major depressive disorder in an open-label, uncontrolled study. **Adv. Ther**, v. 34, p. 2307-2315, 2017.

GUEUTIN, Victor et al., Renal physiology. **Bull Cancer**, v. 99, n. 3, p. 237-49, 2012.

GUYTON, Arthut Clifton, HALL, John E. - **Tratado de Fisiologia Medica**. 13ª edição: Elsevier Editora Ltda.: São Paulo, 1168p. 2017.

HALPERN, Bruno, Combinação Bupropiona com Naltrexone no Tratamento da Obesidade. **Abeso**, v.56, p. 8-10, 2012.

HERNANDES F, PEREIRA M. Obesidade: causas e consequências em crianças e adolescentes. **Revista da Faculdade de Educação Física da UNICAMP**, v. 8, n. 3, p. 47-63, 2010.

HOERGER, T J. et al., The future burden of CKD in the United States: A simulation model for the CDC CKC initiative. **American journal of kidney diseases**, v. 65, n. 63, p. 403-11, 2014.

HOQUE, Mohammad Enamul et al. Economic burden of underweight and overweight among adults in the Asia-Pacific region: a systematic review. **Trop Med Int Health**, v. 21, n. 4, p. 458- 469, 2016.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Natute**. v. 542, p. 177-185, 2017.

IGEL, Leon I., et al., Practical Use of Pharmacotherapy for Obesity, **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1765-1779, 2017.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos, CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 13ª edição: Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 568, 2017.

KHERA, Rhoan et al., Association of Pharmacological Treatments for Obesity With Weight Loss and Adverse Events, **JAMA**, v. 315, n. 22, p. 2424-2434, 2016.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group, KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease, **Kidney Int Suppl**, p. 1–150, 2013.

KOVESDY, Csaba P. et al. Obesity and Kidney Disease: Hidden Consequences of the Epidemic. **Rev Med Chile**, v. 145, p. 281-291, 2017.

LACERDA, Carlos A. M.. Fisiologia e fisiopatologia: Estereologia do rim: determinação do Vv, Nv e volume médio do glomérulo; **J Bras Nefrol**, v. 22, n. 2, p. 103-109, 2000.

LAURENTIUS, Thea et al., High-fat diet-induced obesity causes an inflammatory microenvironment in the kidneys of aging Long-Evans rats. **Journal of Inflammation**, v. 16, n. 14, 2019.

LEVEY, Andrew S. et al., Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review, **JAMA**, v. 313, p. 837–46, 2015

MELDRUM David R. et al., Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions—but do we have the will?, **Fertil Steril.**, v. 107, n. 4, p. 833-839, 2017.

MOON, Kyung Hyun et al. Kidney diseases and tissue engineering. **Methods**, v. 99, p. 112-119, April, 2016.

NANSSEU, Jobert R. et al., Epidemiology of Overweight and Obesity in Adults Living in Cameroon: A Systematic Review and Meta-Analysis, **Obesity (Silver Spring)** . 2019.

NUFFER, Wesley et al., A Comparison of New Pharmacological Agents for the Treatment of Obesit. **Annals of Pharmacotherapy**, p. 1-13, 2016.

OBRI, Arnaud. & CLARET, Marc. The role of epigenetics in hypothalamic energy balance control: implications for obesity, **Cell Stress**, v.3, n.7, p. 208–220, 2019.

ODIGIE, Bolaji Efosa, ODIGIE, Joyce Osarogie. Histo-morphological Examination of the Visceral Organs of Albino Wistar Rats pre-exposed to Ocimum gratissimum Crude Decoction. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 3, n. 5, p36-41, 2014.

PELEGRINI Andreia et al., Indicadores antropométricos de obesidade na predição de gordura corporal elevada em adolescentes. **Rev Paul Pediatr.**, v. 33, n. 1, p. 56-62, 2015.

PICON-RUIZ, Manuel. et al. Obesity and adverse breast câncer risk and outcome: Mecanistic insights and strategies for intervention. **CA Cancer J Clin**, v. 67, n. 5, p. 378-397, 2017.

QUEIROZ, Caetano. et al. Application of BAROS' questionnaire in obese patients undergoing bariatric surgery with 2 years of evolution. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 60-64, 2017.

SALTIEL, Alan R. New therapeutic approaches for the treatment of obesity. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 323, 2016

SANTOS, Amilton Cesar et al., Morphological Description of Unusual Urinary Tract in the Female of a Rodent, *Galea spixii* (Wagler,1931). **Pakistan J Zool.**, v. 46, n.6, p. 1617-1623, 2014.

SILVA JR, Geraldo Bezerra et al., Obesidade e Doença Renal. **J Bras Nefrol**, v. 39, n. 1, p.65-69, 2017.

STURM, Roland., AN, Roupeng., Obesity and Economic Environments, **CA Cancer J Clin**, v. 64, n. 5, p. 337–350, Sep., 2014.

SUN, Guangping et al. Gut microbial metabolite TMAO contributes to renal dysfunction in a mouse model of diet-induced obesity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 493; p. 964-970, 2017.

VERNARELLI, Jacqueline A et al., Dietary energy density and obesity: how consumption patterns differ by body weight status, **Eur J Nutr**, v. 57, n. 1, p. 351-361, 2018.

VERPEUT, Jessica L., BELLO, Nicholas T., Drug safety evaluation of naltrexone/bupropion for the treatment of obesity, **Expert Opin. Drug Saf.**, v. 13 n. 6, p. 831-841, 2014

VICENT, John., Drugs and the Kidneys: Clinical Pharmacology Perspectives. **Clinica Pharmacology & Therapeutics**. v. 102, n. 3, p. 368-372, 2017.

WADDEN, Thomas A. 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.

WEBSTER, Angela C. et al., Chronic kidney disease, **Lancet**, v. 389, p. 1238-52, 2017.

WEDELL-NEERGAARD, Anne-Sophie et al., Cardiorespiratory fitness and the metabolic syndrome: Roles of inflammation and abdominal obesity, **PLoS One**, v. 13, n. 3, e. 0194991, 2018.

WHALEY-CORNELL, Adam, SOWERS, James R. Obesity and kidney disease: from population to basic science and the search for new therapeutic targets. **Kidney International**, v.92, n. 2, p. 313-323, 2017.

WHARTON, Sean et al., Weight loss medications in Canada – a new frontier or a repeat of past mistakes? **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 10, p. 413–417, 2017.

WHO - World Health Organization. Obesity and overweight, Fact sheet N°311, 2018.

WICKMAN, Christopher, KRAMER Holly. Obesity and Kidney Disease: Potential Mechanisms. **Semin. Nephrol.**, v.33, n. 1, p. 14-22, 2013.

WILDING, John P. H., Combination therapy for obesity. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 11, p. 1503-1508, 2017.

WITHROW, Diana, ALTER, David A. The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. **Obes. Rev.**, v. 12, p. 131-141, 2011.

WRIGHT, F. L., RODGERS, Robert John. Acute behavioural effects of bupropion and naltrexone, alone and in combination, in non-deprived male rats presented with palatable mash. **Psychopharmacology**, v. 228, p. 291-307, 2013.

YANG, Ping et al., Inflammatory stress promotes the development of obesity-related chronic kidney disease via CD36 in mice. **Journal of Lipid Research**, v. 58, p. 1417-27, 2017.

YANOVSKI, Suzan Z, YANOVSKI, Jack A., Naltrexone-Extended Release plus Bupropion-Extended Release for Treatment of Obesity. **JAMA**, v. 313, n. 12, p.:1213-1314, 2015.

YASUI, Takahiro et al., Prevalence and epidemiological characteristics of urolithiasis in Japan: national trends between 1965 and 2005, **Urology**, v. 71, n.2, p. 209–13, 2008.

**ANEXO A – OFÍCIO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL –
CEEa/UFPE.**



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife – PE – Brasil
Fones: 2126 8842
cea@ufpe.br

Recife, 30 de agosto de 2018

Ofício nº 75/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Sandra Lopes da Silva**
Centro de Biociências
Departamento de Anatomia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **23076.053208/2014-57**

Certificamos que a proposta intitulada **"Efeito da associação naltrexona/bupropiona sobre a via de sinalização dopaminérgica do coportamento alimentar em ratos wistar obesos"**. Registrada com o sob nº **23076.053208/2014-57** a responsabilidade de **Prof.ª Sandra Lopes da Silva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 29/08/2018.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Setembro 2018 a dezembro/2018
Espécie/linhagem/raça	Ratos isogenico
Nº de animais	54
Peso/Idade	50-250g/30, 60 e 90 dias
Sexo	Machos(42) e fêmea (12)
Origem	Departamento de Nutrição

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691



**ANEXO B – DIETAS OCIDENTALIZADAS DE CRESCIMENTO E
MANUTENÇÃO ELABORADAS PELO DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
DA UFPE (DIETA MODIFICADA DE CAVALCANTE ET AL., 2013).**

PALATÁVEL- CRESCIMENTO		
PALATÁVEL	1kg	15kg
MAISENA	117,00	1755,00
/LABINA	80,00	1200,00
BISCOITO MAISENA CHOC	50,00	750,00
FARINHA DE SOJA	40,00	600,00
CASEÍNA	200,00	3000,00
CELULOSE	40,00	600,00
GOMA	0,00	0,00
óleo milho	10,00	150,00
óleo soja	20,00	300,00
BANHA (*Banha Sadia)	53,00	795,00
MANTEIGA	40,00	600,00
MARGARINA (85% lip)	40,00	600,00
creme de leite parmalat(20%lip)	40,00	600,00
AÇUCAR	220,00	3300,00
SAIS - MIX MINERAL	25,00	375,00
VITAMINAS	7,00	105,00
COLINA	2,50	37,50
METIONINA	2,50	37,50
BHT = 0,14mg	0,14	2,10
NaCl (39,34% de Na)	3,00	45,00
Glutamato Monossódico (12,3% de Na)	10,00	150,00
Total	1000,14	15002,10

PALATÁVEL-MANUTENÇÃO-		
PALATÁVEL	1kg	10kg
MAISENA	157	1570
/LABINA	80	800
BISCOITO MAISENA CHOC	50	500
FARINHA DE SOJA	40	400
CASEÍNA	150	1500
CELULOSE	40	400
GOMA	0	0
OLEO MILHO	15	150
óleo soja	25	250
BANHA (*Banha Sadia)	53	530
MANTEIGA	40	400
MARGARINA (85% lip)	40	400
creme de leite parmalat(20%lip)	40	400
AÇUCAR	220	2200
SAIS - MIX MINERAL	25	250
VITAMINAS	7	70
COLINA	2,5	25
METIONINA	2,5	25
BHT = 0,14mg	0,14	1,4
NaCl (39,34% de Na)	3	30
Glutamato Monossódico (12,3% de Na)	10	100
Total	1000,14	10001,4