

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Ágnis Iohana de Souza Grefenhagen**

**EXPOSIÇÃO GESTACIONAL E LACTACIONAL À DIETA DE CAFETERIA ALTERA  
PRECOCEMENTE O CONTEÚDO DO RECEPTOR MC4 NO TRONCO ENCEFÁLICO  
DE RATOS WISTAR**

**Porto Alegre**

**2019**

**Ágnis Iohana de Souza Grefenhagen**

**EXPOSIÇÃO GESTACIONAL E LACTACIONAL À DIETA DE CAFETERIA ALTERA  
PRECOCEMENTE O CONTEÚDO DO RECEPTOR MC4 NO TRONCO ENCEFÁLICO  
DE RATOS WISTAR**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Coorientadora: Roberta Passos Palazzo

**Porto Alegre**

**2019**

### CIP - Catalogação na Publicação

Grefenhagen, Ágnis Iohana de Souza  
Exposição gestacional e lactacional à dieta de  
cafeteria altera precocemente o conteúdo do receptor  
MC4 no tronco encefálico de ratos Wistar / Ágnis  
Iohana de Souza Grefenhagen. -- 2019.  
36 f.  
Orientadora: Ionara Rodrigues Siqueira.

Coorientadora: Roberta Passos Palazzo.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,  
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Receptor de Melanocortina 4. 2. Tronco  
encefálico. 3. Dieta hipercalórica. 4. Dieta  
hiperpalatável. 5. Comportamento de autolimpeza. I.  
Siqueira, Ionara Rodrigues, orient. II. Palazzo,  
Roberta Passos, coorient. III. Título.

**Ágnis Iohana de Souza Grefenhagen**

**EXPOSIÇÃO GESTACIONAL E LACTACIONAL À DIETA DE CAFETERIA ALTERA  
PRECOCEMENTE O CONTEÚDO DO RECEPTOR MC4 NO TRONCO ENCEFÁLICO  
DE RATOS WISTAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Márcia Giovenardi  
Departamento de Ciências Básicas da Saúde- UFCSPA

---

Prof. Dra. Carla Dalmaz  
Departamento de Bioquímica - UFRGS

---

Prof. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira  
Departamento de Farmacologia – UFRGS

---

Dra. Roberta Passos Palazzo  
PUCRS/UNICNEC

Dedico este trabalho ao meu querido e amado avô Henrique (*in memoriam*) que, mesmo sem saber ler, sempre me incentivou a estudar desde a minha infância.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai Jonatas, que me ensinou o gosto pelo estudo da vida, e à minha mãe Teresinha. O meu maior exemplo de uma mulher forte e determinada. Às minhas irmãs Ágatha, Ariadni, Arihani e Adllen por todo o estímulo em continuar trilhando meu caminho na ciência. Agradeço também a minha amada avó que me ensinou sobre a vida. Vocês são o meu suporte desde o momento em que ingressei na universidade e, certamente, foram peças fundamentais para a concretização deste sonho.

Durante a realização deste trabalho, tive o apoio dos meus amigos que, mesmo me vendo em período de reclusão, sempre foram compreensivos e carinhosos. Gratidão eterna a todos vocês que felizmente posso contar em mais do que duas mãos. Agradeço também à minha comadre Gracy, ao meu afilhado Kainã e à Iolanda, minha avó do coração, por todo amor e compreensão.

Agradeço ao meu amor Alexsander pelo imenso apoio, um colo acolhedor e um ouvido atento nesse e em tantos momentos. Tu é minha inspiração como cientista e pessoa.

Gratidão a minha orientadora Dra Ionara Rodrigues Siqueira que, com sua supervisão, abriu-me as portas para esse mundo. Agradeço por todos os conselhos e puxões de orelha nesses 3 anos de iniciação científica. Eles foram fundamentais para meu crescimento e amadurecimento como futura pesquisadora.

Gratidão imensa aos meus colegas do laboratório de Neuropsicofarmacologia Zíngara, Piethro, Julinha, Laura, Natália, Monique, Sílvia e Chris, além de um super muito obrigada à Fernanda, do laboratório de Neurofarmacologia e Toxicologia Pré-clínica, e à Lolita que me ajudaram inúmeras vezes quando eu estive em apuros. Agradecimentos mais do que especiais aos meus amigos Roberta, Bruno, Fernando, Louisiana e sua pequena Elisa que me auxiliaram nos experimentos e na vida.

Obrigada a todos os meus colegas de estágio no Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas. A última fase da graduação não é nada fácil, mas dividir esse momento com vocês tornou tudo muito mais fácil, leve e divertido. Com certeza levarei comigo essa bonita amizade que nasceu neste período.

Não poderia deixar de mencionar os meus dindos do coração, Elga e Fernando, que desde a infância me encorajaram a entrar na universidade pública. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

Gratidão imensurável à Alexandra Elbakyan, criadora do site Sci-Hub, que possibilitou o acesso ao conhecimento científico no mundo todo e meu acesso à boa parte dos artigos que basearam esse trabalho.

Finalmente agradeço à CPNq, FAPERGS e aos milhares de contribuintes brasileiros que, graças à bolsa de iniciação científica, mantiveram-me dentro da universidade e do laboratório. Espero poder contribuir com o avanço científico e tecnológico do meu país.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é  
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria  
menor se lhe faltasse uma gota”

**Maria Teresa de Calcutá**

## RESUMO

O efeito do consumo materno de dietas hipercalóricas sobre o comportamento alimentar na fase adulta da prole é amplamente avaliado. Nesse caso, o impacto, a curto prazo, da exposição gestacional e lactacional de dieta de cafeteria na prole é um aspecto relevante. Diferentes neurotransmissores e hormônios e suas vias modula o comportamento alimentar, dentre os peptídeos está o  $\alpha$ -MSH (hormônio estimulante de melanócitos). Este peptídeo está ligado ao controle do comportamento alimentar, assim como do comportamento de autolimpeza pela ligação a receptores como o de melanocortina 4 (MC4R) tanto no hipotálamo quanto no tronco encefálico. Além disso, o tronco encefálico é uma região que está associada com a finalização da ingesta e com o tamanho da refeição. O objetivo deste trabalho foi avaliar, na fase do desmame, o comportamento de autolimpeza e o conteúdo do receptor MC4 (MC4R) no tronco encefálico de filhotes machos e fêmeas expostos precocemente à dieta hipercalórica. Ratas prenhes foram randomizadas entre dieta padrão ou dieta hipercalórica e hiperpalatável, as dietas foram mantidas durante o período de lactação. O número de comportamentos de autolimpeza foi avaliado no DPN 20. Os níveis de MC4R no tronco encefálico foram determinados por Western Blotting. Os dados foram analisados através de ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Tukey e Bonferroni. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $P < 0,05$ . Os filhotes machos expostos à dieta hipercalórica apresentaram menor número de comportamento de autolimpeza e um aumento do conteúdo de MC4R no tronco encefálico em comparação com os filhotes expostos à dieta controle. Os dados sugerem que há um efeito sexo-dependente da exposição gestacional e lactacional à dieta de cafeteria, tendo em vista que as fêmeas não apresentaram esse perfil. Nossos dados sugerem que os filhotes machos são mais suscetíveis à exposição gestacional e lactacional à dieta de cafeteria, indicando um desequilíbrio da sinalização da melanocortina no tronco encefálico dos filhotes machos expostos, precocemente, à dieta hipercalórica e hiperpalatável.

**Palavras-chave:** Receptor de melanocortina 4. MC4R. Tronco encefálico. Dieta hipercalórica. Dieta hiperpalatável. Comportamento de autolimpeza.

## ABSTRACT

Maternal consumption of hypercaloric diets causes long-term changes in the offspring's eating behavior and neuronal pathways that control appetite. A variety of hormones and neurotransmitters are involved in modulating these pathways. Among the peptides that make this regulation is  $\alpha$ -MSH, which is produced by cleavage of a polypeptide precursor, pro-opiomelanocortin (POMC). This peptide binds to the melanocortin 4 receptor (MC4R) on both the hypothalamus and brainstem, reducing hunger. Interestingly, the deletion of *Mc4r* causes the absence of grooming behavior, as well as the administration of agonist drugs of this receptor results in excessive triggering of this behavior. Therefore, this is a parameter capable of reflecting the state of satiety. Still, the brainstem is a region that is associated with the completion of the intake and the size of the meal. Therefore, their involvement in satiety control is a relevant aspect. That said, the aim of this paper is to evaluate the impact of gestational and lactational exposure of cafeteria diet on the brainstem of weaning male and female pups, specifically to assess the impact on MC4 receptor (MC4R) content and number of groomings. Pregnant rats were randomized between standard and cafeteria diet, which was maintained during the lactation period. The number of groomings was assessed on DPN 20. Brainstem MC4R levels were determined by Western blotting. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey and Bonferroni post hoc and Student's t-test for pup analysis with higher and lower latency to start the meal. Results were considered statistically significant when  $P < 0.05$ . Male pups exposed to the cafeteria diet showed an increased brainstem MC4R content compared to control pups. No changes were observed in females of the same group. Again, male puppies also had a reduced number of groomings compared to control puppies, especially that had a lower latency to start eating behavior test. The data suggest that there is a gender-dependent effect of gestational and lactational exposure to the cafeteria diet, given that male pups appear to be more susceptible to this type of exposure. These same pups showed a decrease in grooming and increased brainstem MC4R content. Our data suggest that male puppies are more susceptible to gestational and lactational exposure to the cafeteria diet. In this sense, a lower number of self-cleaning behavior and increased MC4R content may indicate an imbalance of melanocortin signaling in the brainstem of male pups exposed early to the cafeteria diet.

Keywords: Melanocortin 4 receptor. MC4R. Brainstem. Hypercaloric Diet. Hyperpalatable Diet. Grooming.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Consumo de calorias diárias per capita em países desenvolvidos.....	12
Figura 2 – Sinalização do controle da saciedade.....	15
Figura 3 – Desenho Experimental.....	18
Figura 4 – Efeito da dieta de cafeteria no número de <i>groomings</i> .....	21
Figura 5 – Efeito da dieta de cafeteria no número de <i>groomings</i> em machos com menor e maior latência para iniciar a ingesta.....	22
Figura 6 - Conteúdo de MC4R no tronco encefálico de filhotes machos e fêmeas expostos à dieta de cafeteria e dieta padrão.....	22

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

$\alpha$ -MSH	Hormônio Estimulante de Alfa-Melanócitos
AgRP	Peptídeo Relacionado ao Gene Agouti
BDNF	Neurotrofina Derivada do Cérebro
CCK	Colecistocinina
DPN	Dia Pós-Natal
DG	Dia Gestacional
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
MC4R	Receptor de Melanocortina 4
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do Trato Solitário
POMC	Pró-opiomelanocortina
PVN	Núcleo Paraventricular

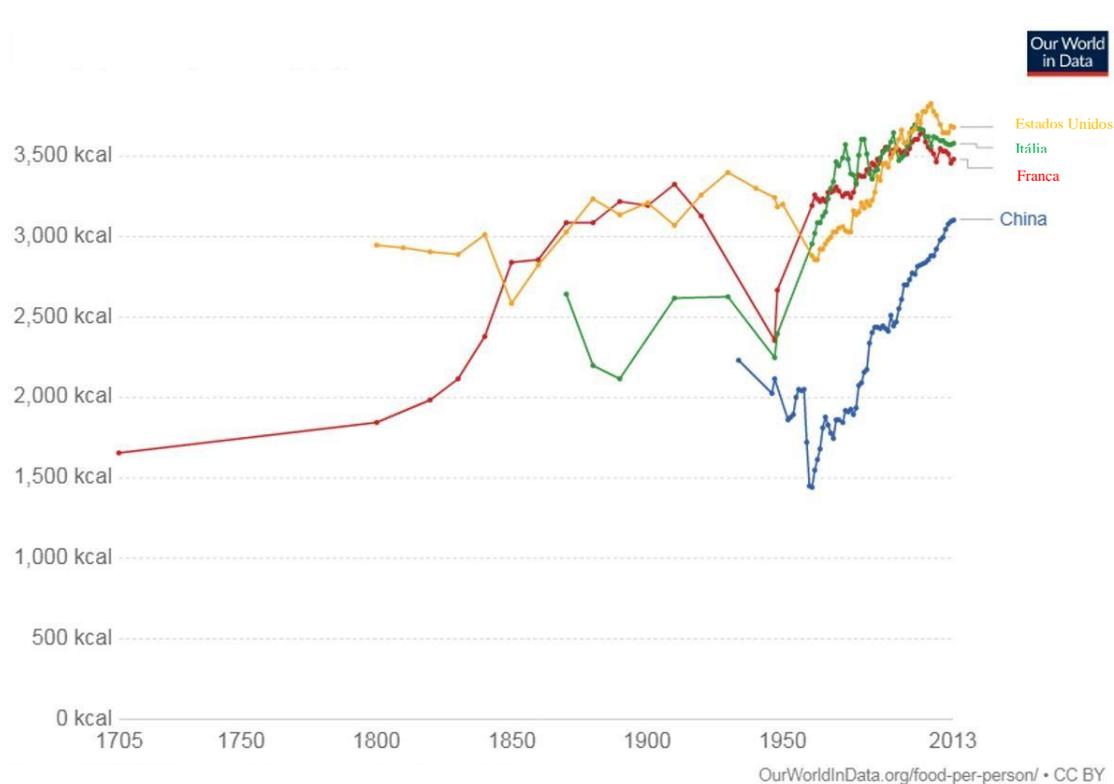
## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
2.1.	OBJETIVO GERAL	18
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>19</b>
3.1.	ANIMAIS	19
3.2.	MODELO DE DIETA DE CAFETERIA	20
3.3.	COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA: <i>GROOMING</i>	21
3.4.	IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS: <i>WESTERN BLOTTING</i>	21
3.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>23</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>25</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>28</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>29</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a ingestão de uma dieta baseada em alimentos refinados e ultraprocessados, ricos em gordura e açúcares e pobres em fibras e proteínas, tem aumentado em diversos países de maneira preocupante (Figura 1)(FRANCISCHI et al., 2000; POPKIN, 2009). O baixo custo e fácil acesso contribuem para a alta procura desses alimentos e, em conjunto com a falta de exercício físico e maus hábitos alimentares, uma dieta hipercalórica pode resultar em doenças cardiovasculares, desequilíbrio hormonal, diabetes, danos cognitivos e obesidade (ADLERCREUTZ, 1990; PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003).

**Figura 1- Fornecimento de calorias diárias per capita em países desenvolvidos**



Fonte: FAO (2017).

Durante a gestação, a exposição à dieta “ocidental” pode levar ao desenvolvimento de obesidade materna e trazer prejuízos para o desenvolvimento do feto (VASUDEVAN; RENFREW; MCGUIRE, 2011). Cabe mencionar que a obesidade e seu consequente desequilíbrio nutricional é o distúrbio mais comum nesse período (SEBIRE et al., 2001). Dados alarmantes dentre a população do Reino Unido indicaram a prevalência de obesidade e sobrepeso pré-gestacionais entre os anos de 1990 e 2002/2004, período em que 18,9% das grávidas iniciaram a gestação em quadro de obesidade (KANAGALINGAM et al., 2005). Ainda, no Brasil, um estudo com uma coorte de 5314 gestantes realizado entre 1991 e 1995, em seis capitais, indica que a prevalência de sobrepeso e obesidade é de 19,2% e 5,5% respectivamente (NUCCI et al., 2001).

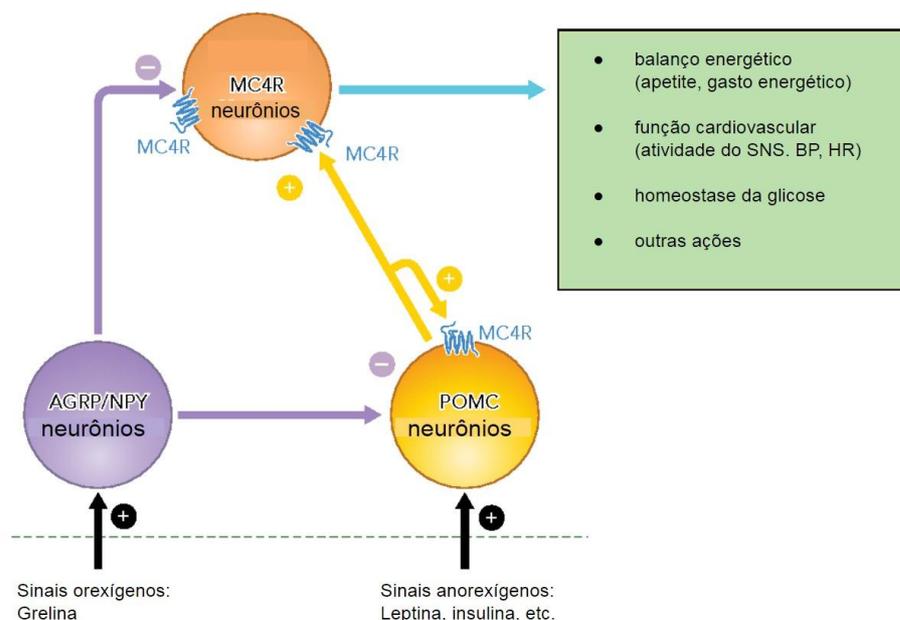
Como se trata de um momento crucial do desenvolvimento, alterações na dieta durante a gestação produzem significativas mudanças na morfologia, neurofisiologia e neuroquímica do sistema nervoso central (MORGANE et al., 1993). Em curto prazo, encontram-se alterações de tamanho e peso, anormalidades congênitas e nascimento prematuro (HEERWAGEN et al., 2010; MELZER et al., 2010). Evidências apontam que também há mudanças comportamentais da prole em longo prazo, quando avaliados na vida adulta. Por exemplo, a exposição à dieta rica em calorias pode alterar o padrão de ingestão alimentar da prole num período tardio da vida, levando ao consumo de maiores quantidades de alimento por refeição. Esta alteração favorece o surgimento de fenótipo associado à obesidade (KHALYFA et al., 2013; TAMASHIRO et al., 2009; WRIGHT et al., 2011). Wright e colaboradores demonstraram que machos adultos com histórico de exposição precoce à dieta de cafeteria, que mimetiza o estilo “fastfood”, revelaram uma taxa de frequência de episódios alimentares maior do que o dobro encontrados nos machos controles. Nas fêmeas expostas também foram reveladas diferenças comportamentais em comparação ao grupo controle, entretanto, estas foram relacionadas ao tempo total destinado à alimentação, não ao número total de episódios como nos machos. Estes dados demonstram que a dieta impacta em longo prazo (na fase adulta) a busca alimentar de forma sexo-dependente (WRIGHT et al., 2011).

Embora os efeitos comportamentais e bioquímicos da exposição precoce a dietas hipercalóricas em curto prazo ainda sejam pouco estudados, recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou

que a exposição gestacional e lactacional à dieta de cafeteria altera o padrão de comportamento alimentar no início da vida (PALAZZO et al, submetido). A exposição precoce à dieta de cafeteria aumentou o número e reduziu o intervalo entre as refeições (episódios de alimentação finalizados cada vez que o animal permanece sem consumir por pelo menos 5 minutos), sem qualquer impacto sobre os ataques individuais ao alimento (“bouts”), em ambos os gêneros, o que sugere o impacto sobre a memória episódica de uma refeição no DPN 20. Adicionalmente, induziu um maior consumo total de alimentos, sem alterar o peso corporal da prole. A interpretação dos dados nos levou a inferir que houve um prejuízo na memória episódica (memória da refeição), anterior a alterações no peso corporal e aumento do peso do tecido adiposo. Neste sentido, foi descrito que a exposição gestacional e lactacional à dieta de cafeteria reduziu o conteúdo de BDNF hipocampal em ambos os gêneros, assim concluímos que a dieta hipercalórica altera precocemente a memória episódica da refeição precedendo alterações na massa corporal.

Contudo, o papel da saciedade nas alterações comportamentais observadas não pode ser excluído. Nesse contexto, a avaliação de parâmetros neuroquímicos envolvidos na saciedade torna-se relevante ainda no início da vida, uma vez que alterações consolidadas nessa fase podem impactar o comportamento alimentar a longo prazo. Tais alterações de comportamento podem estar relacionadas, em parte, a um desequilíbrio de reguladores dos centros de controle da saciedade, como é o caso dos neurotransmissores liberados pelos neurônios AgRP (peptídeo relacionado ao gene *agouti*) e as melanocortinas (MORTON et al., 2006; SATOH et al., 1998). Esta última é uma classe de hormônios peptídicos sintetizada em neurônios hipotalâmicos e do tronco encefálico (neurônios POMC) via ligação de leptina em seus receptores (Figura 2). A partir disso, ocorre a síntese das melanocortinas por meio da clivagem de um precursor peptídico, denominado pró-opiomelanocortina (POMC), e os produtos da clivagem se ligam a pelo menos 5 tipos de receptores (COWLEY et al., 2001; PRITCHARD; WHITE, 2007). Dentre eles encontra-se o receptor de melanocortina 4 (MC4R), caracterizado pelo acoplamento à proteína G e pelo papel crucial na regulação do peso corporal, apetite, homeostase da glicose, metabolismo de lipídios, entre outros (ADAN et al., 2006; ROSSI et al., 2011). É válido mencionar que o hormônio alfa-estimulante dos melanócitos ( $\alpha$ -MSH), um dos derivados da clivagem da POMC, se liga ao MC4R, tanto em neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo quanto no núcleo do trato solitário (NTS) do tronco, desencadeando diminuição da ingestão e aumento do gasto energético, assim, o MC4R também possui um envolvimento no controle da saciedade (ADAN et al., 2006).

**Figura 2- Sinalização do controle da saciedade**



Representação esquemática das vias de sinalização do controle da saciedade. Sinais orexígenos e anorexígenos oriundos do tecido adiposo, estômago e outros órgãos atravessam a barreira hematoencefálica e se ligam a receptores em neurônios POMC do hipotálamo e do tronco encefálico. A ativação, por sua vez, causa a liberação de melanocortinas, como a  $\alpha$ -MSH que se ligam em receptores MC4 localizados em neurônios de 2ª ordem. A ativação desse receptor gera várias respostas, inclusive relacionadas ao balanço energético. Fonte: Adaptado e traduzido de Silva et al. (2014, p. 198).

A exposição a dietas hipercalóricas induz alterações em MC4R, especificamente sobre os níveis de RNA mensageiro do receptor no hipotálamo de roedores adultos (HUANG et al., 2003). Contudo, poucos trabalhos avaliam o efeito de dietas hipercalóricas sobre o receptor MC4 no tronco encefálico. Sabe-se que a administração de agonistas deste receptor em regiões próximas ao tronco altera o comportamento alimentar de ratos machos adultos, reduzindo a quantidade de alimento ingerido por refeição. Em contraste, a administração de antagonista apresentou o efeito oposto (GRILL et al., 1998). Ainda, a deleção do gene *Mc4r* em camundongos e humanos resulta no aumento do peso corporal e hiperfagia (FAROOQI et al., 2003; HUSZAR et al., 1997). Cabe mencionar que diferenças entre machos e fêmeas foram observadas em relação ao efeito da deleção

do gene *Mc4r*. No caso, camundongos fêmeas *Mc4r*  $-/-$  apresentaram um aumento da ingestão alimentar e do peso corporal em comparação com machos com a mesma deleção (CLEGG et al., 2003; HUSZAR et al., 1997; SUTTON et al., 2006).

Cabe mencionar que a sinalização de MC4R no tronco encefálico afeta o tamanho da refeição, sendo suficiente para alterar a ingestão de alimentos via mudança da sinalização da saciedade (ADAN et al., 2006; ZHENG et al., 2005). Dito isso, a avaliação da expressão do receptor MC4 no tronco encefálico, ainda em fases iniciais do desenvolvimento, consiste em um tópico relevante e complementar aos nossos achados prévios.

Ainda, há evidências do envolvimento do sistema de melanocortinas sobre o comportamento tipo *grooming* (autolimpeza), uma vez que a ativação de MC4R foi correlacionada com antecipação da finalização da ingestão; e que modelos com perda de função do receptor revelaram ausência do *grooming* induzido por melanocortinas. Esses achados corroboram o entendimento de que a liberação endógena de melanocortinas durante a concretização da saciedade consequentemente ativa MC4R, induzindo o comportamento natural de higiene pós-prandial (ADAN et al., 1999; MUL et al., 2012, 2013; ZHENG et al., 2005). Logo, a alteração no número de autolimpeza poderia estar associada à alteração do estado de saciedade.

Considerando que a exposição gestacional e lactacional à dieta hipercalórica alterou precocemente o comportamento alimentar, especificamente a quantidade de alimento ingerido, o número de refeições e o primeiro intervalo entre refeições, é possível sugerir que esta dieta também modifique o comportamento de autolimpeza e os níveis, no tronco encefálico, do receptor MC4.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da exposição gestacional e lactacional à dieta de cafeteria sobre o comportamento e parâmetro neuroquímico, no tronco encefálico, relacionados à saciedade no período do desmame.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

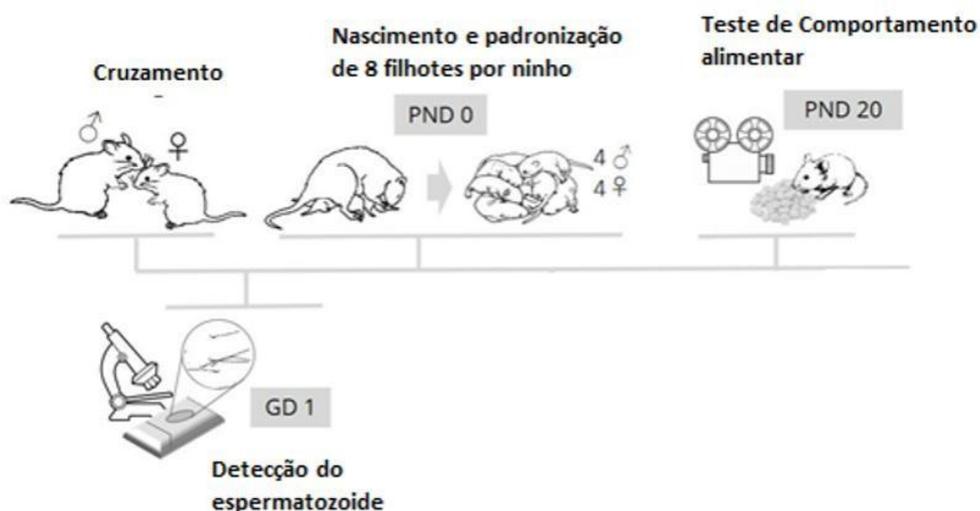
- Avaliar o impacto da exposição gestacional e lactacional à dieta de cafeteria sobre o comportamento de autolimpeza dos filhotes machos e fêmeas após a refeição.
- Determinar o efeito da exposição gestacional e lactacional à dieta de cafeteria sobre o conteúdo de receptor MC4 no tronco cerebral da prole.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob número 160561 (CEUA/HCPA). Ratos Wistar Fêmeas (n=14) e machos (n=7) foram obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL/UFRGS) e foram aclimatados por uma semana na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os animais foram mantidos com acesso a água e comida à vontade e sob ciclo claro-escuro de 12h, em temperatura de 22°C e umidade de 45%. Realizou-se o cruzamento de fêmeas e machos e a detecção do espermatozóide no lavado vaginal foi utilizado como indicativo do primeiro dia de gestação (DG 1). As ratas prenhes foram randomizadas em dois grupos: dieta padrão (controle) e dieta de cafeteria, sendo que ambos os grupos receberam comida e água à vontade. Tais dietas foram substituídas diariamente para permitir o acesso a alimentos frescos e variados. No dia pós-natal 0 (DPN 0), realizou-se a padronização da ninhada em 4 fêmeas e 4 machos por progenitora, resultando em 6 ninhadas dieta padrão e 6 ninhadas dieta de cafeteria que seguiram até o fim do período lactacional. Para a realização do teste de comportamento (DPN 20), duas fêmeas e dois machos por progenitora foram utilizados. Um dia após o teste (DPN 21), os filhotes foram eutanasiados e tronco encefálico foi dissecado e congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C até a realização da técnica de Western Blotting. Todos os cuidados para minimizar dor e sofrimento foram atenciosamente seguidos conforme Lei No. 11794 (Brasil), bem como a utilização de um número mínimo de animais para produzir dados científicos relevantes.

Figura 3 - Desenho experimental



Fonte: Palazzo et al. (submetido)

### 3.2. Modelo de Dieta de Cafeteria

O modelo utilizado foi previamente descrito por Estadella e colaboradores (ESTADELLA et al., 2004). Tal dieta contém alimentos altamente palatáveis como salsicha, salgadinho, bolacha recheada, waffer, leite condensado, batatas chips e refrigerante e foram ofertadas juntamente com dieta padrão para evitar carência nutricional. A dieta de cafeteria consiste de 60% de carboidratos, 20% de lipídios, 15% de proteínas e 5% de outros constituintes (minerais, vitaminas, conservantes, etc) totalizando 4,18 kcal/g, enquanto que a dieta padrão (Nuvilab CR-1, NUVITAL®, Curitiba, PR, Brazil) é composta de 55% de carboidratos, 22% de proteínas, 4,5% de lipídios e 18,5% de cálcio, vitaminas, conservantes, minerais e fibras e totaliza 2,93 kcal/g (Tabela 1).

**Tabela 1 - Dieta de cafeteria: composição calórica**

Alimentos	Kcal/g/ml
Bolacha recheada	4,76
Leite condensado	3,20

Salgadinho	4,68
Salsicha mista	2,97
Waffer	5,32
Refrigerante	0,42

Composição calórica dos alimentos fornecidos às ratas prenhas durante a gestação e lactação. O cálculo foi feito com base nas informações prestadas pelo fabricante no rótulo das embalagens. Fonte: elaborada pela autora.

### 3.3. Comportamento de autolimpeza (*grooming*)

No DPN 20, os filhotes foram submetidos a um jejum de 3 horas e expostos a um campo aberto, em que receberam a mesma dieta fornecida às genitoras, por um período de 1 hora. Além disso, foi realizada a gravação durante todo o período do teste para avaliação posterior do comportamento. Como parâmetro, foi observado o número de vezes em que o animal realizou o comportamento de autolimpeza (*grooming*). O alimento fornecido foi pesado antes e depois do experimento.

### 3.4. Imunodeteção de proteínas: Western Blotting

Foi realizada a técnica de Western Blotting para avaliar o conteúdo do receptor de melanocortina 4. Para isso, o tronco encefálico foi homogeneizado com inibidores de protease e a quantidade de proteínas na amostra foi detectada pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras então foram preparadas com 30  $\mu$ l de Tampão de Laemmli 4X, agitadas em um agitador vórtex e submetidas a banho seco (95°) durante 2 minutos. Logo após, 25 $\mu$ g de proteína das amostras foram separadas em um gel de poliacrilamida SDS. As proteínas no gel foram transferidas, eletroforicamente, para uma membrana de nitrocelulose com 30% de metanol e bloqueadas em 5% de albumina em TBS contendo 0,05 de Tween-20. A membrana foi incubada durante a noite com o anticorpo anti-MC4R diluído conforme instruções do fabricante (H-60: Sc-28992 Santa Cruz Biotechnology) e posteriormente incubada com anticorpo secundário 1:500 (Abcam ab205718) durante 2 horas em temperatura ambiente. Logo após, a membrana foi exposta aos

reagentes de quimioluminescência (ECL) e a banda de interesse foi detectada através do fotodocumentador IBRIGHT C100 e o Ponceau foi utilizado como normalizador (KLEIN; KERN; SOKOL, 1995; ROMERO-CALVO et al., 2010). O conteúdo de MC4R foi quantificado através de software ImageJ Fiji.

### 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

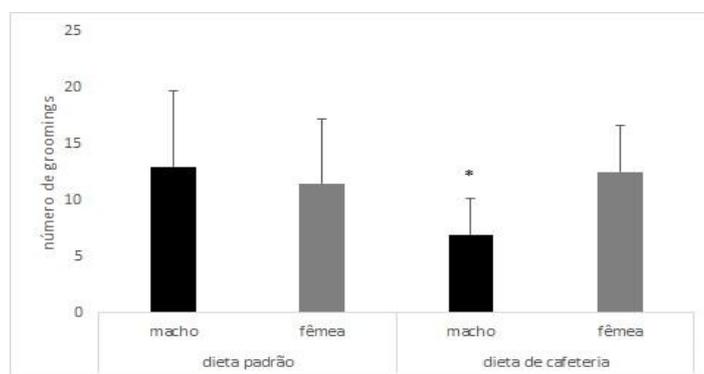
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS© versão 26. A normalização dos dados foi analisada pelo teste de Levene em que se observou uma distribuição normal. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de 2 vias, considerando a dieta e o sexo, seguido de post hoc de Tukey. O número de comportamento de autolimpeza foi analisado por ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Bonferroni.

Para avaliação do envolvimento do comportamento de autolimpeza com a latência para iniciar uma refeição, os machos foram divididos em animais com menor ou maior latência para iniciar a refeição, considerando a mediana desse parâmetro, e o comportamento de autolimpeza foi analisado com o Teste T de Student. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) e as diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

A exposição gestacional e lactacional à dieta de cafeteria reduziu o comportamento de auto-limpeza (número total de *groomings*) somente em ratos machos ( $F(1,44)=8,184$ ;  $P= <0.01$ ) (Fig.4).

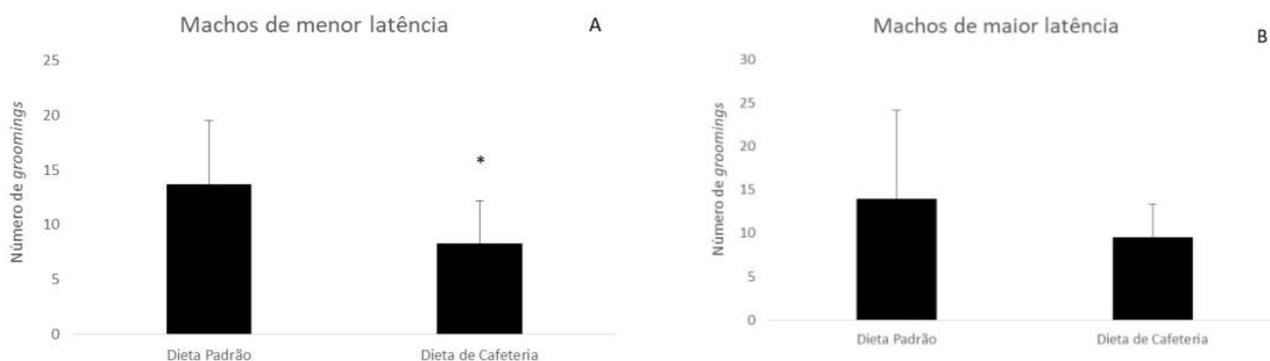
**Figura 4 - efeito da dieta de cafeteria no número de *groomings***



Resultados expressos em média  $\pm$  DP. ANOVA de 2 vias. (n=9-12). \*estatisticamente diferente do controle dieta padrão.

O grupo de machos foi subdividido em machos com maior e menor latência para iniciar a ingesta, e o comportamento de autolimpeza foi analisado. Tal separação foi realizada com o objetivo de aprofundar a análise do comportamento de *grooming*. A exposição gestacional e lactacional à dieta de cafeteria foi capaz de reduzir o número de *groomings* em ratos com menor latência para iniciar a ingesta (Fig. 5A) ( $P=0,02$ ), o que não atingiu diferença estatística nos machos de maior latência (Fig. 5B).

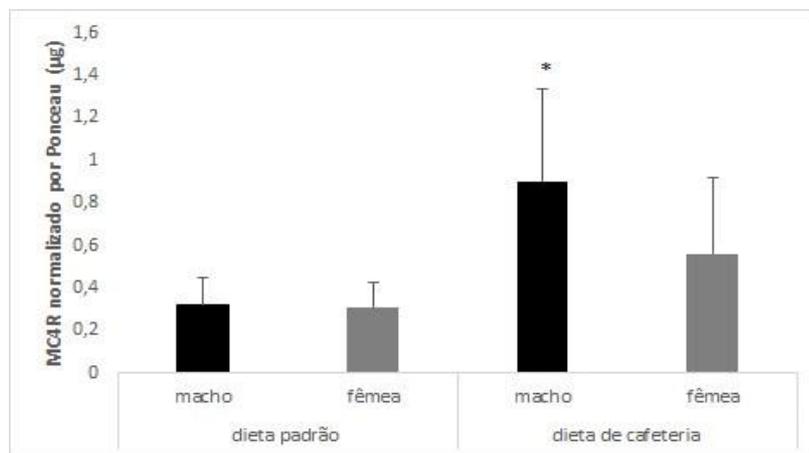
**Figura 5 - Efeito da dieta de cafeteria no número de *groomings* em machos com menor e maior latência para iniciar a ingesta**



(A) Machos com menor latência para iniciar a ingesta. (B) Machos com maior latência para iniciar a ingesta. Resultados expressos em média  $\pm$  DP. Teste T de Student. (n=9-14). \*estatisticamente diferente do controle dieta padrão.

Os filhotes machos do grupo dieta de cafeteria apresentaram um aumento da expressão de MC4R no tronco encefálico na fase do desmame (DPN 20). Esse resultado foi estatisticamente diferente dos filhotes controle, tanto em comparação com os machos quanto com as fêmeas ( $F(1,16) = 10,114$ ;  $P = 0,006$ ). Não houve diferença significativa nas fêmeas do grupo dieta de cafeteria (Fig. 6).

**Figura 6 - Conteúdo de MC4R no tronco encefálico de filhotes machos e fêmeas expostos à dieta de cafeteria e dieta padrão**



Resultados expressos em média  $\pm$  DP. \* estatisticamente diferente do controle dieta padrão.

## 5. DISCUSSÃO

A exposição gestacional e lactacional à dieta hipercalórica foi capaz de alterar o conteúdo de MC4R no tronco encefálico dos filhotes machos, além do parâmetro comportamental - número de *groomings*.

Apenas ratos machos expostos à dieta de cafeteria revelaram um número menor de *groomings* no teste de comportamento alimentar. É interessante destacar que, quando se analisa os ratos machos com menor latência para iniciar a ingesta, observa-se um número de *grooming* ainda menor nos machos expostos à dieta de cafeteria. A descrição desse comportamento após a refeição é documentada desde o século passado. Quando finalizam a refeição, roedores tendem a executar o comportamento de autolimpeza por um curto período e, então, descansar ou dormir (GIBBS; YOUNG; SMITH, 1973). Em 1960, Bolles observou que há um aumento da incidência desse comportamento no fim da refeição (BOLLES, 1960). Logo, o número menor de *groomings* nos machos pode ser um indicativo de maior susceptibilidade desses animais a um desequilíbrio do balanço energético.

Embora remeta à relação mãe-filhote e ao autocuidado, o comportamento do tipo *grooming* após a refeição pode ser entendido também como um reflexo do estado de saciedade e parece estar relacionado a mudanças nos níveis do MC4R (MUL, 2013; ADAN, 1994). Ratos que possuem mutações resultantes em perda de função deste receptor, apresentam ausência do comportamento de *grooming* (MUL, 2012). Ainda, a administração de fármacos como o Melanotan II (MTII), agonista de MC4R, revelou uma atenuação da ingesta de alimentos avaliados pelos parâmetros, tamanho e duração da refeição, sem alterações significativas na frequência alimentar ou no intervalo médio pós-prandial (ZHENG, 2005). Tais resultados evidenciam o papel central do MC4R no desencadeamento deste comportamento.

Nossos dados demonstram que os níveis do MC4R no tronco encefálico de ratos Wistar de 3 semanas, submetidos à dieta controle, não apresentam diferenças entre os sexos. Cabe mencionar que a diferença entre machos e fêmeas na expressão de *Mc4r* foi descrita em diferentes estruturas/órgãos. Os hipotálamos e rins de fêmeas apresentaram aumento da expressão desse gene, enquanto que em fígados de machos foi maior comparado às fêmeas (QU et al., 2014). O aumento significativo dos níveis do MC4R no tronco encefálico de machos filhotes sugere um efeito sexo-dependente da exposição precoce à dieta hipercalórica. Em outros modelos animais,

como em suínos, a exposição materna a uma dieta de restrição nutricional provocou a diminuição precoce da expressão de MC4R somente em hipotálamos de filhotes fêmeas (ÓVILO et al., 2014). Ainda, Zheng e colaboradores demonstraram que camundongos filhotes machos expostos à dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação, apresentam aumento da expressão de MC4R e POMC hipotalâmico a longo prazo (32 semanas) (ZHENG et al., 2015). Inclusive, machos parecem ser mais suscetíveis ao ganho de peso e desenvolvimento de obesidade, sugerindo que também há diferenças metabólicas entre os sexos (HONG et al., 2009). Mercer e Archer (2005) demonstraram que uma dieta altamente hipercalórica aumenta o nível de expressão do gene *Mc4r* hipotalâmico em 60% de ratos machos Sprague-Dawley, após 24 horas de exposição à dieta, demonstrando uma resposta aguda. (MERCER; ARCHER, 2005) Nossos dados demonstram que a exposição gestacional e lactacional à dieta hipercalórica aumenta precocemente (3 semanas) os níveis do MC4R em ratos Wistar machos.

O aumento dos níveis do MC4R observado nesses filhotes pode indicar uma resposta fisiológica compensatória a alguma alteração do seu ligante e/ou outros mecanismos moleculares que aumentem a expressão do receptor, embora no presente estudo isto não tenha sido investigado. Alterações nos níveis de POMC podem ser observadas em animais expostos à dieta rica em gordura na fase gestacional. Primatas não humanos expostos no período fetal apresentam aumento na expressão de POMC e do MC4R, sem reflexos sobre o conteúdo dos derivados da POMC no hipotálamo (GRAYSON et al., 2010). Camundongos adultos exibem uma diminuição da metilação do promotor de MC4R, sugerindo que a dieta influencia na desmetilação da região promotora e conseqüentemente afeta a expressão do gene, uma vez que a desmetilação do DNA facilita o acesso da maquinaria de transcrição (WIDIKER et al., 2010). Sendo assim, o aumento da expressão de MC4R observada em machos no presente trabalho sugere que a exposição a dietas hipercalóricas na fase da gestação e amamentação aumenta precocemente o conteúdo desse receptor. Cabe mencionar que estas observações foram feitas na fase do desmame, antes da consolidação da obesidade.

Uma outra hipótese que é passível de ser formulada diz respeito ao aumento do MC4R relacionado com os níveis de peptídeo relacionado ao gene Agouti (AgRP). Este atua como um agonista inverso de MC4R, cuja ligação a esse receptor resulta em um aumento da ingestão alimentar. Sendo assim, AgRP atua inibindo sua atividade (HASKELL-LUEVANO; MONCK, 2001; NIJENHUIS; OOSTEROM; ADAN, 2001). A propósito, alguns trabalhos descrevem os efeitos de dietas

hiperlipídicas sobre os níveis deste peptídeo. Por exemplo, se observou que apenas ratos Wistar machos (PND 200), expostos à dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação, apresentaram uma significativa diminuição da expressão de AgRP no hipotálamo, mesmo quando expostos à dieta padrão a partir da fase de desmame (SCHELLONG et al., 2019). As fêmeas, neste caso, não diferiram dos animais controle. Ainda, camundongos de 3 semanas que consumiram dieta rica em gordura saturada também apresentaram uma redução nos níveis de AgRP uma semana após a exposição (WANG; STORLIEN; HUANG, 2002). Como descrito anteriormente, o AgRP é um dos ligantes do MC4R e sua expressão aparenta estar diminuída em animais expostos a dietas hipercalóricas. Logo, podemos sugerir que o aumento do conteúdo do MC4R pode estar associado a uma diminuição deste peptídeo. Possivelmente, um mecanismo de respostas fisiológica compensatória.

## **6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

Nossos dados sugerem que os filhotes machos são mais suscetíveis à exposição gestacional e lactacional à dieta de cafeteria. A diminuição do comportamento de autolimpeza e o aumento do conteúdo do MC4R podem indicar um desequilíbrio da sinalização da melanocortina no tronco encefálico dos filhotes machos.

Os dados coletados neste trabalho abrem perspectivas para investigação mais acurada do conteúdo do MC4R e seu ligante no hipotálamo e de outras moléculas relacionadas a via neuronal do controle da saciedade, como o AgRP. A avaliação de colecistocinina, um importante hormônio secretado no intestino, também é válida uma vez que atua no tronco encefálico e influencia no comportamento alimentar.

## 7. REFERÊNCIAS

ADAN, Rah et al. The MC4 receptor and control of appetite. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 149, p. 815–827, 2006. Disponível em: <[www.bripharmacol.org](http://www.bripharmacol.org)>. Acesso em: 23 jun. 2019.

ADAN, Roger A. .. et al. Characterization of melanocortin receptor ligands on cloned brain melanocortin receptors and on grooming behavior in the rat. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 378, n. 3, p. 249–258, 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299999004653>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

ADLERCREUTZ, H. Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum**, [s. l.], v. 201, p. 3–23, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2173856>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

BELCHIOR SÉ MARCIA MARIA MELO QUINTSLR, Miriam et al. **Ministra do Planejamento, Orçamento e Gestão Coordenação de Trabalho e Rendimento INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

BOLLES, Robert C. Grooming behavior in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 306–310, 1960. Disponível em: <<http://content.apa.org/journals/com/53/3/306>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

BRADFORD, Marion M. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], 1976.

CLEGG, Deborah J. et al. Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. **Diabetes**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 682–7, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12606509>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

COWLEY, Michael A. et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, [s. l.], v. 411, n. 6836, p. 480–484, 2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/35078085>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

ESTADELLA, Debora et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 218–224, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14962690>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

FAROOQI, I. Sadaf et al. Clinical Spectrum of Obesity and Mutations in the Melanocortin 4 Receptor Gene. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 348, n. 12, p. 1085–1095, 2003. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa022050>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

FRANCISCHI, Rachel Pamfilio Prado De et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 17–28, 2000. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732000000100003&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732000000100003&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 21 nov. 2019.

GIBBS, James; YOUNG, Robert C.; SMITH, Gerard P. Cholecystokinin decreases food intake in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, [s. l.], v. 84, n. 3, p. 488–495, 1973. Disponível em: <<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/h0034870>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

GRAYSON, B. E. et al. Changes in Melanocortin Expression and Inflammatory Pathways in Fetal Offspring of Nonhuman Primates Fed a High-Fat Diet. **Endocrinology**, [s. l.], v. 151, n. 4, p. 1622–1632, 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2009-1019>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

GRILL, H. J. et al. Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting

effects on feeding and body weight. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 18, n. 23, p. 10128–35, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9822766>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

HASKELL-LUEVANO, C.; MONCK, E. K. Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. **Regulatory peptides**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 1–7, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257308>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

HEERWAGEN, Margaret J. R. et al. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 299, n. 3, p. R711–R722, 2010. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00310.2010>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

HONG, Jina et al. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. **Nutrition Journal**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 11, 2009. Disponível em: <<http://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2891-8-11>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

HUANG, Xu-Feng et al. Altered levels of POMC, AgRP and MC4-R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity. **Brain Research**, [s. l.], v. 992, n. 1, p. 9–19, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899303035534>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

HUSZAR, Dennis et al. Targeted Disruption of the Melanocortin-4 Receptor Results in Obesity in Mice. **Cell**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 131–141, 1997. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400818656>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

KANAGALINGAM, Malini G. et al. Changes in booking body mass index over a decade: retrospective analysis from a Glasgow Maternity Hospital. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, [s. l.], v. 112, n. 10, p. 1431–1433, 2005. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0528.2005.00685.x>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

KHALYFA, A. et al. Effects of late gestational high-fat diet on body weight, metabolic regulation and adipokine expression in offspring. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 37, n. 11, p. 1481–1489, 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ijo201312>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

KLEIN, D.; KERN, R. M.; SOKOL, R. Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochemistry and molecular biology international**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 59–66, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545052>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

MELZER, Katarina et al. Effects of recommended levels of physical activity on pregnancy outcomes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 202, n. 3, p. 266.e1-266.e6, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002937809020924>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

MERCER, J. G.; ARCHER, Z. A. Diet-induced obesity in the Sprague–Dawley rat: dietary manipulations and their effect on hypothalamic neuropeptide energy balance systems. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 1068–1072, 2005. Disponível em: <<https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/33/5/1068/65165/Dietinduced-obesity-in-the-SpragueDawley-rat>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

MORGANE, Peter J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 91–128, 1993. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763405802349>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, [s. l.], v. 443, n. 7109, p. 289–295, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature05026>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

MUL, Joram D. et al. Melanocortin Receptor 4 Deficiency Affects Body Weight Regulation,

Grooming Behavior, and Substrate Preference in the Rat. **Obesity**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 612–621, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527895>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

MUL, Joram D. et al. Melanocortin MC4 receptor-mediated feeding and grooming in rodents. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 719, n. 1–3, p. 192–201, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299913005384>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

NIJENHUIS, Wouter A. J.; OOSTEROM, Julia; ADAN, Roger A. H. AgRP(83–132) Acts as an Inverse Agonist on the Human-Melanocortin-4 Receptor. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 164–171, 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend.15.1.0578>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

NUCCI, Luciana Bertoldi et al. Nutritional status of pregnant women: prevalence and associated pregnancy outcomes. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 502–507, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102001000600002&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102001000600002&lng=en&tlng=en)>. Acesso em: 21 nov. 2019.

ÓVILO, Cristina et al. Prenatal programming in an obese swine model: sex-related effects of maternal energy restriction on morphology, metabolism and hypothalamic gene expression. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 111, n. 4, p. 735–746, 2014. Disponível em: <[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114513002948/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114513002948/type/journal_article)>. Acesso em: 21 nov. 2019.

PEREIRA, Luciana O.; FRANCISCHI, Rachel P. De; LANCHETA JR., Antonio H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 111–127, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302003000200003&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302003000200003&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 21 nov. 2019.

POPKIN, Barry M. Global Changes in Diet and Activity Patterns as Drivers of the Nutrition Transition. In: **Emerging Societies - Coexistence of Childhood Malnutrition and Obesity**.

Basel: KARGER, 2009. v. 63p. 1–14.

PRITCHARD, Lynn E.; WHITE, Anne. Neuropeptide Processing and Its Impact on Melanocortin Pathways. **Endocrinology**, [s. l.], v. 148, n. 9, p. 4201–4207, 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2006-1686>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

QU, Hai E. et al. Differential expression of the melanocortin-4 receptor in male and female C57BL/6J mice. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 3245–3256, 2014.

ROMERO-CALVO, Isabel et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 401, n. 2, p. 318–320, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206115>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

ROSSI, Jari et al. Melanocortin-4 Receptors Expressed by Cholinergic Neurons Regulate Energy Balance and Glucose Homeostasis. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 195–204, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413111000118>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

SATOH, Noriko et al. Satiety effect and sympathetic activation of leptin are mediated by hypothalamic melanocortin system. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 249, n. 2–3, p. 107–110, 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304394098004017>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

SHELLONG, Karen et al. Sex-specific epigenetic alterations of the hypothalamic Agrp-Pomc system do not explain ‘diabesity’ in the offspring of high-fat diet (HFD) overfed maternal rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 75, 2020.

SEBIRE, NJ et al. Maternal obesity and pregnancy outcome: a study of 287 213 pregnancies in London. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 1175–1182, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11477502>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

SUTTON, Gregory M. et al. Diet-Genotype Interactions in the Development of the Obese, Insulin-Resistant Phenotype of C57BL/6J Mice Lacking Melanocortin-3 or -4 Receptors. **Endocrinology**, [s. l.], v. 147, n. 5, p. 2183–2196, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2005-1209>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

TAMASHIRO, Kellie L. K. et al. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. **Diabetes**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 1116–25, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188431>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

VASUDEVAN, Chakrapani; RENFREW, Mary; MCGUIRE, William. Fetal and perinatal consequences of maternal obesity. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, [s. l.], v. 96, n. 5, p. F378-82, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530101>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

WANG, Hongqin; STORLIEN, Len H.; HUANG, Xu-Feng. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 282, n. 6, p. E1352–E1359, 2002. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00230.2001>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

WIDIKER, S. et al. High-fat diet leads to a decreased methylation of the Mc4r gene in the obese B6 and the lean B6 mouse lines. **Journal of Applied Genetics**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 193–197, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453306>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

WRIGHT, Thomas M. et al. Exposure to maternal consumption of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behaviour in the rat. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 785–793, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004940>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

ZHENG, Huiyuan et al. Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative**

**and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 289, n. 1, p. R247–R258, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15746303>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

ZHENG, Jia et al. Maternal and post-weaning high-fat, high-sucrose diet modulates glucose homeostasis and hypothalamic POMC promoter methylation in mouse offspring. **Metabolic Brain Disease**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 1129–1137, 2015.