

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

RAFAEL TAMBORENA MALHEIROS

**EFEITOS DE DIETA HIPERCALÓRICA SOBRE OS ASPECTOS DE DEPRESSÃO
E ANSIEDADE EM RATOS**

Uruguaiana

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

RAFAEL TAMBORENA MALHEIROS

**EFEITOS DE DIETA HIPERCALÓRICA SOBRE OS ASPECTOS DE DEPRESSÃO
E ANSIEDADE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PMPGCF) da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dra. Morgana Duarte da Silva.

Uruguaiiana

2018

RAFAEL TAMBORENA MALHEIROS

**EFEITOS DE DIETA HIPERCALÓRICA SOBRE OS ASPECTOS DE DEPRESSÃO
E ANSIEDADE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PMPGCF) da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Ciências Biológicas II.

Dissertação defendida e aprovada em: 20 de dezembro de 2018.

Banca Examinadora:

Profa. Dr^a. Morgana Duarte da Silva.
Orientadora
(PMPGCF / Unipampa)

Prof. Dr. Felipe Pivetta Carpes
Membro Titular
(PMPGCF / Unipampa)

Prof. Dr. Vanderlei Folmer
Membro Titular
(PPG Bioquímica / Unipampa)

Prof^a. Dr^a. Mauren Assis de Souza
Membro Suplente
(PMPGCF / Unipampa)

Prof. Dr. Leonardo Magno Rambo
Membro Suplente
(PPG Bioquímica / Unipampa)

AGRADECIMENTOS

Obrigado!

Por alguns dias refleti como deveria iniciar meus agradecimentos e cheguei à conclusão que a melhor forma seria com um simples, sincero e humilde “obrigado”. Então, antes de iniciar meus agradecimentos quero justificar o “obrigado”, que do latim “*obligare*” significa ligar por todos os lados, ligar moralmente. Desta forma, expresso uma dívida que me liga em um laço moral, mas também de amor, amizade, parceria, coleguismo com todos aqueles que contribuíram para chegar até aqui.

Obrigado!

Aos meus pais Sergio e Ada que de maneira incansável me proporcionaram a maior herança que poderiam me deixar que é o conhecimento. Agradeço a vocês por acreditarem junto comigo que o filho da costureira e do repartidor de pão poderia um dia alcançar a graduação, a especialização, o mestrado e futuramente o doutorado. Tenham sempre a certeza que vocês são a base que permitiu a minha evolução pessoal e profissional.

Obrigado!

À Camila, minha esposa, companheira, melhor amiga, por me mostrar que a vida é melhor quando se tem alguém para comemorar as conquistas, chorar as derrotas e estender a mão para levantar e começar novamente. Nestes nove anos em que nos reencontramos neste mundo, só tenho a agradecer a Deus por permitir mais uma vez ter você ao meu lado na alegria e na tristeza, na saúde e na doença por todos os dias desta e de outras vidas. Antes tínhamos nós dois e agora, com o Miguel, nós temos tudo! Meu amor faltam palavras para te agradecer por ter me dado à paz, o amor e a esperança necessária para sempre continuar em frente.

Obrigado!

A minha família de sangue e emprestada Matheus, Carolina, Viviane e Raimundo, por sempre estarem ao meu lado para apoiar, conversar, rir e fazer deste mundo um lugar melhor de se viver. Agradeço por me permitirem acreditar que ainda existem pessoas neste mundo que fazem o bem sem esperar nada em troca, fazem o bem apenas por amar ao próximo.

Obrigado!

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Morgana, por ter me proporcionado uma visão nova quanto a este grande universo que é a pesquisa. Agradeço pela amizade e por todos os ensinamentos, conselhos e alguns puxões de orelha que permitiram que juntos construíssemos esta dissertação de mestrado.

Obrigado!

Ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências fisiológicas por prezar pela construção do conhecimento. Agradeço a coordenação, a secretaria de pós-graduação, professores e aos grupos de pesquisa GPFis, GESTOX por todo apoio, atenção e ensinamentos prestados, demonstrando o real significado de parceria em pesquisa.

Obrigado!

Aos meus colegas da Unipampa e também aos de multicêntrico (UFRGS, USP-Ribeirão Preto, UFMG e UFVJM Diamantina) pela parceria nas aulas teóricas e práticas, mas principalmente pela amizade que construímos.

Encerro meus agradecimentos com o seguinte pensamento: o homem não “descobre”, mas, relaciona os dados a ciência e o resultado desta elaboração mental, da reflexão, do estabelecimento de relações, da observação de causas, de consequências, de continuidades, de oposições é o conhecimento (HUSSERL, 1980). Obrigado a todos vocês por juntos construirmos o conhecimento!

RESUMO

O acúmulo de tecido adiposo, provocado pelo consumo de alimentos hipercalóricos, gera disfunções do sistema endócrino, que afetam, por exemplo, a expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Alterações cognitivas e emocionais, como depressão e ansiedade, são doenças associadas aos níveis de BDNF. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar efeito de uma dieta hipercalórica sobre distúrbios de humor – depressão e ansiedade - e a expressão de BDNF no hipocampo de ratos jovens. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da UNIPAMPA sob o número 039/2017. No total foram utilizados 20 ratos da linhagem *Wistar* (8 semanas de idade). Os animais foram divididos em dois grupos: dieta controle - que recebeu ração industrial; e dieta hipercalórica (HD) - que recebeu ração com banha de porco e óleo de soja. Após 45 dias de dietas foram avaliados os níveis de obesidade, adiposidade, níveis séricos de colesterol total, low density liprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), triglicerídeos e glicose; teste do nado forçado; labirinto em cruz elevado; e expressão de BDNF no hipocampo, através de imunoenensaio por ELISA. Como resultado, verificamos que o grupo controle aumentou seu peso significativamente ao longo das semanas em relação ao grupo HD. Porém, o grupo HD apresentou maior concentração de tecido adiposo, com elevado índice de adiposidade em relação ao grupo controle. Os parâmetros bioquímicos sanguíneos apresentaram valores significativamente maiores nos animais HD. Ademais, o grupo HD apresentou redução da expressão de BDNF no hipocampo. Ainda, os animais do grupo HD apresentaram aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado, bem como redução do tempo de permanência dos animais nos braços abertos e do número de entradas nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado. Este estudo demonstrou que a dieta hipercalórica induziu o aumento na concentração do tecido adiposo, o que pode estar associado à redução da expressão de BDNF no hipocampo, promovendo alterações comportamentais de aspectos depressivos e de ansiedade nos animais obesos.

Palavras-chaves: Dieta hipercalórica; Hipocampo; BDNF; Depressão, Ansiedade.

ABSTRACT

The accumulation of adipose tissue, caused by the consumption of hypercaloric foods, generates dysfunctions of the endocrine system, which affects, for example, the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Cognitive and emotional changes, such as depression and anxiety, are diseases associated with BDNF levels. Thus, the objective of this work was to verify the effect of a hypercaloric diet on mood disorders - depression and anxiety - and the expression of BDNF in the hippocampus of young rats. All procedures were approved by the UNIPAMPA Ethics Committee under number 039/2017. In total, 20 Wistar rats (8 weeks old) were used. The animals were divided into two groups: control diet - which received industrial ration; and Diet High-Fat (HD) - which received ration with lard of pig and soybean oil. After 45 days of diet, the levels of obesity, adiposity, serum total cholesterol, low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), triglycerides and glucose levels were evaluated; forced swimming test; high labyrinth; and expression of BDNF in the hippocampus by ELISA immunoassay. As a result, we verified that the control group increased their weight significantly over the weeks in relation to the HD group. However, the HD group had a higher concentration of adipose tissue, with a high adiposity index in relation to the control group. Blood biochemical parameters showed significantly higher values in HD animals. In addition, the HD group showed reduction of BDNF expression in the hippocampus. In addition, the animals in the HD group showed increased immobility time in the forced swimming test, as well as reduction of the time of permanence of the animals in the open arms and the number of open arms entrances, both in the high cross maze test. This study demonstrated that the hypercaloric diet induced an increase in the concentration of adipose tissue, which may be associated with reduced BDNF expression in the hippocampus, promoting behavioral changes of depressive and anxiety aspects in obese animals.

Key-words: Diet High-Fat; Hippocampus; BDNF; Depression, Anxiety

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia da dislipidemia metabólica.....	18
Figura 2. Ciclo inflamatório: Obesidade-Depressão.....	21
Figura 3. Experimental design. Os animais receberam dieta controle (ração comercial) ou dieta hipercalórica (HD). O peso corporal, a circunferência torácica (TC) e o comprimento naso-anal foram mensurados antes e semanalmente após o início das dietas. Nos dias 43 e 44 após o início das dietas foram realizados os testes comportamentais do labirinto em cruz e do nado forçado. Após as avaliações, os animais foram sacrificados e os materiais retirados para realização dos testes bioquímicos e BDNF.....	26
Figura 4. Avaliações da indução de obesidade durante e após os 45 dias de tratamento dos grupos dieta controle (CD), dieta hipercalórica (HD). A: peso corporal dos animais; B: peso das gorduras perigonadal e retroperitoneal; C: peso do fígado; D: circunferência torácica; E: comprimento naso-anal; F: índice de adiposidade..	27
Figura 5. Efeitos da indução de obesidade por dieta hipercalórica comparada a dieta controle no perfil comportamental de depressão e ansiedade. A: Tempo de imobilidade durante o teste do nado forçado; B: Tempo de permanência dos animais nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado; C: número de entradas nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado.....	28
Figura 6. Expressão de BDNF no hipocampo dos animais do grupo controle e dieta hipercalórica após 45 dias de indução de obesidade	29

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Parâmetros bioquímicos após 45 dias de indução de obesidade dos grupos controle (CD) e dieta hipercalórica (HD)	28
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

CD – Dieta Controle

HD – Dieta hipercalórica

HDL – *High density lipoprotein*

LDL – *Low density liprotein*

TC – Circunferência Torácica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivo específico	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Dieta hipercalórica	15
3.2 Tecido Adiposo	16
3.3 Hipocampo e BDNF	17
3.4 Depressão e Ansiedade	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Animais e dieta	22
4.2 Avaliação da obesidade	22
4.3 Avaliação comportamental	22
4.4 Níveis de BDNF no hipocampo	23
4.5 Testes bioquímicos	23
4.6 Análise estatística	24
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO.....	32
8. REFERÊNCIAS	33
9. ANEXO I	41

1 INTRODUÇÃO

Dietas hipercalóricas são usadas em modelos animais e produzem resultados funcionais e representativos, mimetizando a vida diária de humanos obesos (Attuquayefio *et al.*, 2017). Elas são caracterizadas por consumo excessivo de gorduras e açúcares e estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos (Dreber *et al.*, 2017; Kasen *et al.*, 2008). A síndrome metabólica engloba as principais complicações geradas pelo excesso de tecido adiposo sendo caracterizada por uma miscelânea de sinais e sintomas, que aumentam o risco de doenças cardiovasculares e endócrinas relacionadas à hipertensão, hiperglicemia e dislipidemia (Hoffman *et al.*, 2015).

O tecido adiposo é um complexo reservatório energético, responsável por produzir substâncias endócrinas, que regulam o balanço energético, a secreção de peptídeos e de proteínas bioativas. Desta forma, podemos considerar o tecido adiposo como um órgão endócrino, que pela sua extensão, tem grande repercussão nas funções corporais (Prado *et al.*, 2009). O acúmulo de tecido adiposo gera co-morbidades que estão diretamente relacionadas a problemas de humor, como depressão e ansiedade (Needham *et al.*, 2010; Garipey *et al.*, 2010). Dados epidemiológicos descrevem que esses transtornos apresentam elevada prevalência em indivíduos obesos afetando a qualidade de vida e contribuindo para o agravamento da doença de base (Castanon *et al.*, 2014; Lopresti & Drummond, 2013). Há um crescente reconhecimento de que a má qualidade da dieta está associada a uma alta prevalência de transtornos de humor em adultos (Akbaraly *et al.*, 2009; Sanchez-Villegas *et al.*, 2012), mas, talvez de forma mais alarmante, em crianças (Kohlboeck *et al.*, 2012) e adolescentes (Jacka *et al.*, 2011).

Nesta fase da vida o encéfalo ainda está em desenvolvimento e a adição de uma dieta rica em calorias pode promover insultos neurais que afetam diretamente a neurogênese e consequentemente o desenvolvimento cognitivo, observado em modelos animais (Fu *et al.*, 2017; Boitard *et al.*, 2012). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma neurotrofina amplamente expressa no sistema nervoso (Hohn *et al.*, 1990; Leibrock *et al.*, 1989), com papel importante no controle da homeostase energética e do peso, modulando a atividade dos neuropeptídeos envolvidos na ingestão alimentar (Pelleymounter *et al.*, 1995). A diminuição dos níveis de BDNF, com a consequente diminuição da neuroplasticidade do hipocampo, também está associada à patogênese de doenças como a depressão (Duman and Monteggia, 2006; Malberg and Schechter, 2005).

Considerando a necessidade de compreender os efeitos da obesidade e das alterações de humor, este trabalho teve como objetivo induzir a obesidade com dieta hipercalórica, verificando a presença de comportamentos tipo-depressivos e de ansiedade e seus possíveis mecanismos em ratos jovens.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Verificar o efeito de uma dieta hipercalórica sobre distúrbios de humor e a expressão de BDNF no hipocampo de ratos jovens.

2.2 Objetivos Específicos

- Mensurar o peso corporal, circunferência torácica e comprimento naso-anal em ratos jovens fazendo uso de dieta hipercalórica;
- Analisar os parâmetros sanguíneos bioquímicas dos ratos após período de alimentação por dieta hipercalórica;
- Verificar alterações nos comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansiosogênico nos ratos alimentados por dieta hipercalórica;
- Determinar os níveis de BDNF no hipocampo dos ratos após 7 semanas de dieta hipercalórica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A presente revisão bibliográfica irá descrever os principais pontos abordados nesta pesquisa e a interação entre os mesmos. Para tanto foi realizada pesquisa na base de dados Pubmed, utilizando os descritores: “Obesity”, “Diet”, “High-Fat”, “Hippocampus”, “Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)”, “Depression”, “Anxiety”. Como critério de inclusão foram utilizados artigos escritos na língua inglesa, que abordaram a interação de ao menos um dos descritores. O manuscrito que será escrito a partir dos resultados dessa dissertação será enviado para o Jornal “Nutritional Neuroscience”, periódico com impacto 3,313 e Qualis B1 na área de Ciências Biológicas II - CAPES.

3.1 Dieta Hipercalórica

O desenvolvimento de dietas hipercalóricas ricas em carboidratos e lipídeos tem sido largamente utilizado em modelos animais para induzir obesidade, mimetizando o que acontece em humanos e auxiliando as pesquisas nesta área. Estes modelos experimentais tornaram-se uma importante ferramenta para o estudo da fisiopatologia da obesidade e suas comorbidades. Além disso, apresentam potencial utilidade para investigar o efeito do perfil dietético sobre o metabolismo e estrutura de múltiplos órgãos e tecidos (Rosini *et al.*, 2012, Sampey *et al.*, 2011). Existem evidências de que o perfil dietético apresenta uma notável capacidade de modificar o metabolismo celular, podendo levar a uma profunda reprogramação molecular, que inclui a modulação dos genes que regulam a estrutura, a função, o crescimento e a sobrevivência celular (Schwenk *et al.*, 2013).

No entanto, alguns fatores devem ser considerados na utilização deste tipo de modelo de indução, como a variabilidade na composição da gordura e açúcar; a oferta da dieta - se contínua ou intermitente; o tempo de indução do protocolo; e o consumo individual entre os animais. No entanto, apesar dessas variáveis as dietas hipercalóricas reproduzidas em laboratório apresentam resultados funcionais, singulares aos encontrados em humanos (Baker *et al.*, 2017). A maior parte dos estudos utilizam modelos com roedores, em geral ratos e camundongos, que permitem avaliações metabólicas nos sistemas cardiovascular, endócrino, hepático e cerebral, bem como, permite verificar alterações comportamentais, cognitivas e humorais (Reichelt *et al.*, 2015; Robinson *et al.*, 2015; Harris e Apolzan, 2012).

3.2 Tecido Adiposo

Atualmente compreende-se que o tecido adiposo forma um complexo reservatório energético, que sofre regulação hormonal de mecanismos autócrinos (mensageiro químico produzido por uma célula que age nesta mesma célula) e parócrinos (mensageiro químico produzido por uma célula que age sobre células vizinhas). Além disso, os adipócitos também são responsáveis pela produção de substâncias endócrinas, que regulam várias funções orgânicas como o balanço energético, a secreção de peptídeos, de proteínas bioativas e adipocinas – citocinas secretadas pelo tecido adiposo (Blüher, 2013). As alterações no fenótipo dos adipócitos, causadas pela obesidade, geram um processo inflamatório crônico de baixo grau, caracterizado pelo aumento dos níveis circulatórios de ácidos graxos e fatores inflamatórios, os quais são responsáveis por uma série de alterações metabólicas (Wensveen *et al.*, 2015; Prado *et al.* 2009).

Nos últimos anos, a forma de dislipidemia decorrente da ação combinada da resistência à insulina e do aumento da concentração de tecido adiposo é reconhecida como "dislipidemia metabólica" (Klop, Elte & Cabezas, 2013). Esta resistência é causada por alterações na estrutura e na função celular dos adipócitos que passam a liberar adiposinas e macrófagos em grande quantidade. Com isso, há um aumento na lipólise com consequente liberação de ácidos graxos na circulação (Figura 1), provocando uma lipotoxicidade sistêmica (Pagliassotti *et al.*, 2016; Hardy, Czech & Corvera, 2012). Logo, tais alterações são consideradas uma síndrome metabólica gerada pela inflamação crônica, com dislipidemia e resistência à insulina, a qual é responsável por disfunções que aumentam o risco de doenças como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, tromboembolismo venoso, diabetes (Blokhin & Lentz, 2013; Johnson, Milner & Makowski, 2012).

Desta forma, o acúmulo de tecido adiposo causa uma série de alterações homeostáticas no metabolismo de lipídeos e glicose, nas funções hormonais e na modulação inflamatória. Estas alterações geram um distúrbio sistêmico de repercussão periférica e central como a resistência à insulina, dislipidemia e até disfunções cognitivas (Luo & Liu, 2016; Blüher, 2016). Com isso, o estudo das alterações provocadas pelo aumento do tecido adiposo busca elucidar os mecanismos fisiológicos deste problema, bem como, seus efeitos nos diferentes sistemas do organismo humano.

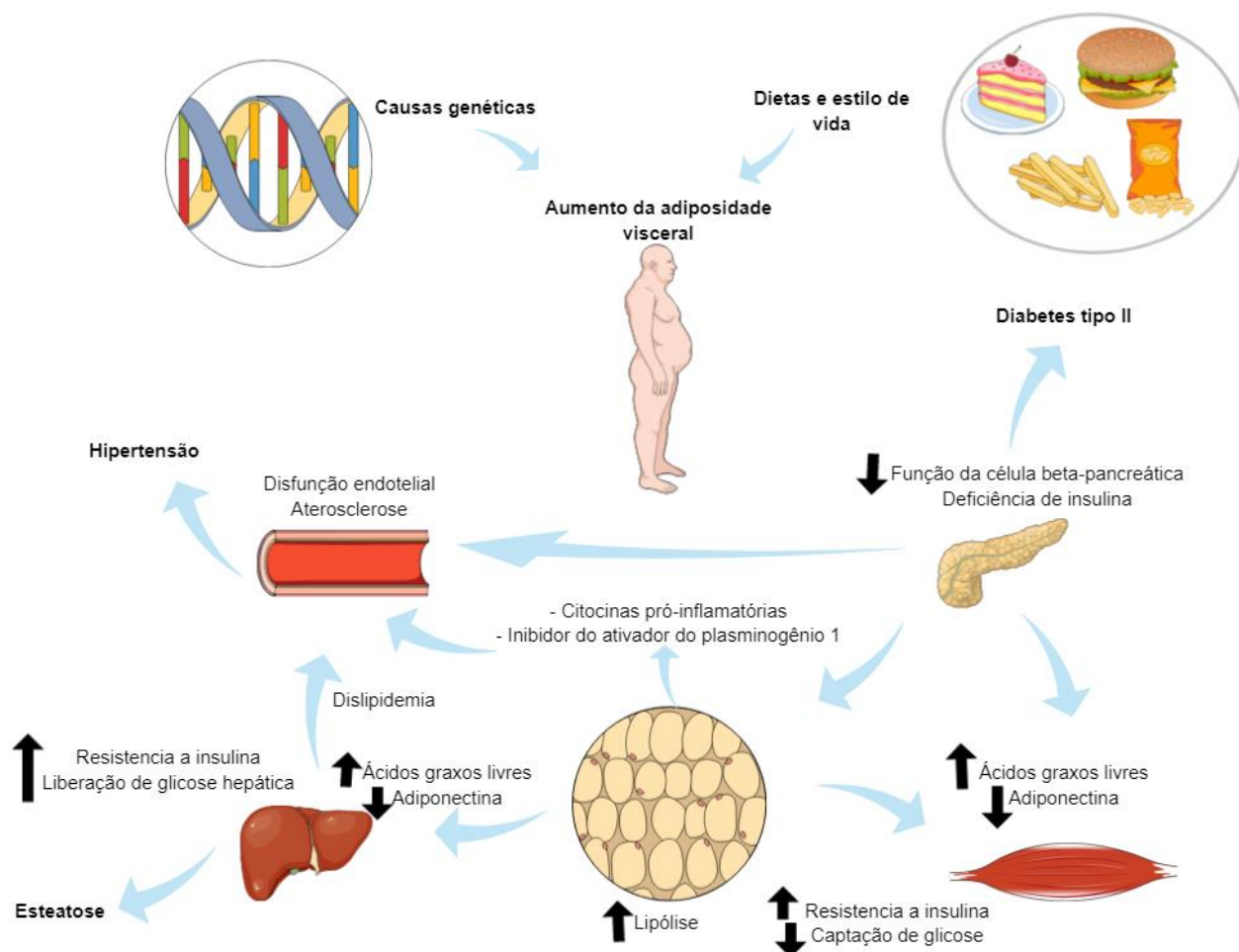


Figura 1: Fisiopatologia da dislipidemia metabólica. Fonte: Próprio autor.

3.3 Hipocampo e BDNF

A região hipocampal está relacionada a respostas emocionais estando em meio a um complexo centro neural que regula a ansiedade e a emoção. O hipocampo está no centro do circuito relacionado as respostas emocionais, projetando-se para outras áreas encefálicas como o córtex-pre-frontal. Neste contexto, ele parece inibir certos comportamentos, associados ao aparecimento e manutenção da ansiedade. Ainda, projeções do hipocampo, direta ou indiretamente, a amígdala, estão implicados nos processos de medo e interação social (Adhikari, Topiwala & Gordon, 2010; Padilla-Coreano *et al.*, 2016). Segundo Boldrini e colaboradores o hipocampo humano é menor em pacientes depressivos em comparação a indivíduos saudáveis. Desta forma, lesões ou distúrbios no hipocampo podem promover alterações no comportamento emocional (Boldrini *et al.* 2014).

O hipocampo é a principal estrutura encefálica ligada à atividade do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que é uma proteína dimérica, da família das neurotrofinas, que

atua no desenvolvimento do sistema nervoso durante a fase embrionária e no crescimento, diferenciação e apoptose dos neurónios no adulto (Maletic *et al.*, 2007; Ridder *et al.*, 2005). Níveis reduzidos de BDNF no encéfalo estão associados a patogênese da depressão (Duman e Monteggia, 2006; Larsen *et al.*, 2010). Thompson Ray *et al* encontraram valores reduzidos de BDNF no córtex e no hipocampo de indivíduos com depressão, esquizofrenia e vítimas de suicídio (Thompson Ray *et al.*, 2011). O mesmo foi encontrado por Schmidt e colaboradores ao avaliarem os níveis séricos de BDNF em pacientes com depressão (Schmidt *et al.*, 2011). Ainda, o BDNF hipocampal pode ser reduzido por fatores de estresse agudo ou crônico que afetam a expressão do RNA mensageiro (RNAm) do BDNF e os níveis de proteína no hipocampo (Lee *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2007).

Os distúrbios metabólicos gerados pela obesidade como hiperglicemia, dislipidemia, estresse oxidativo e dano inflamatório podem alterar a estrutura funcional do hipocampo, com isso gerando a redução na expressão de BDNF (Fuchs *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2016). Tais mudanças na via de sinalização do BDNF representa o principal componente desencadeador de alterações comportamentais de depressão e ansiedade (Martinowich *et al.*, 2007). Portanto, a depressão deriva da combinação entre fatores ambientais (como obesidade e estresse) e o genético, tendo estes como desencadeadores da redução dos níveis de BDNF (Shalev *et al.*, 2009; Trajkovska, *et al.*, 2008).

O BDNF também está envolvido com a regulação do balanço energético, onde estudos demonstram que a disfunção deste mecanismo causa hiperfagia e consequentemente obesidade (Noble *et al.*, 2011; Meek *et al.*, 2013). Em estudo realizado com camundongos deficientes em BDNF, observou-se o desenvolvimento de obesidade, com hiperglicemia e hiperfagia (Kernie *et al.*, 2000). Por sua vez, o desenvolvimento de obesidade a partir de modelos de indução, por dieta hipercalórica ou modificação genética, causa danos na expressão de BDNF no hipocampo. Desta forma, a hiperglicemia gerada pela obesidade inibe a expressão e a liberação circulatória de BDNF no sistema nervoso central (Krabbe *et al.*, 2007). Logo, podemos inferir que a associação entre a obesidade e as alterações da expressão de BDNF formam um sistema de retroalimentação.

3.4 Depressão e Ansiedade

A obesidade também está ligada a distúrbios cognitivos e emocionais que emergem como fatores de risco adicionais para complicações emocionais como a depressão e a ansiedade (Luppino *et al.*, 2012). Modelos experimentais de indução de obesidade em animais proporcionam um ambiente mais próximo ao humano quanto a ingestão de alimentos hipercalóricos (Castanon, Lasselin & Capuron, 2014). Além disso, o uso de indução por dietas hipercalóricas representa uma importante ferramenta na avaliação da relação entre a obesidade e as alterações comportamentais do tipo-depressiva e ansiogênica em animais (Mansur, Brietzke & McIntyre, 2015; Yamada *et al.*, 2012).

A depressão é caracterizada por um estado de humor deprimido generalizado, perda de interesse em atividades habituais e capacidade reduzida de sentir prazer. A fenomenologia clínica de episódios de depressão maior implica sistemas cerebrais envolvidos na regulação do humor, da ansiedade, do medo, processamento de recompensa, atenção, motivação, respostas ao estresse, cognição social e neurovegetativa função (ou seja, sono, apetite, energia, libido) (Price and Deverts, 2010; Ambrósio *et al.*, 2018). A depressão é um transtorno prevalente em pessoas com obesidade, sendo que ambos os transtornos estão associados à maior taxa de morbidade e mortalidade. Em países desenvolvidos a depressão é a principal causa de incapacidade, devido ao comprometimento funcional e redução da qualidade de vida, acarretando em um alto custo em saúde (de Wit *et al.*, 2010). A obesidade pode aumentar em 55% o risco de depressão (Luppino *et al.*, 2012). Além disso, adolescentes deprimidos correm maior risco para o desenvolvimento e, principalmente, persistência da obesidade durante a adolescência (Goodman & Whitaker, 2002). A compreensão dos determinantes biológicos e sociais compartilhados que ligam o humor deprimido e a obesidade pode auxiliar na prevenção e no tratamento de ambos os transtornos (Goodman & Whitaker, 2002; Ambrósio *et al.*, 2018).

Por sua vez, a ansiedade é um estado fisiológico caracterizado por componentes cognitivos, somáticos, emocionais e comportamentais que produzem medo apreensão, fadiga, tensão e em casos extremos transtorno de pânico, estresse pós-traumático entre outros. Ela ainda pode estar acompanhada por sensações físicas, como palpitações cardíacas e falta de ar, enquanto o componente cognitivo acarreta a expectativa de um perigo difuso e certo (Price e Drevets; 2010; André *et al.*, 2014). Vários estudos evidenciam que a indução de obesidade por dietas hipercalóricas pode gerar disfunções cognitivas como a ansiedade em roedores

(Reichelt *et al.*, 2015; André *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2018). Em revisão sistemática realizada por Silva (2015), o autor afirma que transtornos emocionais como a ansiedade podem ocasionar distúrbios alimentares que geram a obesidade (Silva, 2015). Com isso, a ansiedade também representa um fator de risco para obesidade, assim como a obesidade pode influenciar no perfil ansiogênico. Portanto, estes distúrbios podem ocorrer de forma concomitante no mesmo indivíduo (Geriepy, Nitka e Schmitz, 2010).

Sabe-se que uma inflamação periférica de baixo grau parece ser um dos mecanismos biológicos comuns entre transtorno de humor e obesidade. No entanto, é importante destacar que essas condições podem ocorrer de forma independente, pois a inflamação periférica pode não ser observadas em indivíduos obesos (Castanon *et al.*, 2014; Ambrósio *et al.*, 2018).

O acúmulo de tecido adiposo branco pode gerar uma resposta inflamatória sistêmica e uma infiltração de células imunes: (a) com ativação de receptores Toll-like receptor 4 (TLR-4) – que se ligam a lipopolissacarídeos (LPS); (b) secreção de mediadores pró-inflamatórios por células imunes e adipócitos; (c) e aumento da resistência à insulina e lipogênese (Figura 2). Tanto a obesidade quanto a depressão também estão associados a alterações na microbiota intestinal, aumentando a capacidade de permeabilidade e o vazamento de produtos microbianos capazes de induzir a ativação de células imunes e a liberação de citocinas. O vazamento de ácidos graxos pode levar à síntese de lipídios complexos e seu armazenamento, aumentando a coleta energética (Kaufmann *et al.*, 2017; Ambrósio *et al.*, 2018). Independentemente de suas principais fontes de produção, os mediadores inflamatórios periféricos podem acessar o sistema nervoso central através de transportadores via barreira hemato-encefálica ininterrupta ou até mesmo via ativação de neurônios periféricos, causando neuroinflamação. Uma vez no encéfalo, a produção de mediadores inflamatórios afeta várias funções neuroquímicas, incluindo o metabolismo das monoaminas, o do glutamato, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), a neuroplasticidade e a neurogênese (Figura 2).

Distúrbios cognitivos e de humor também estão relacionados ao estresse oxidativo e disfunções no sistema endócrino (Sellbom & Gunstad, 2012; Hryhorczuk *et al.*, 2013). Os distúrbios metabólicos observados na obesidade geram o aumento nos níveis de cortisol, leptina e insulina, acarretando no agravamento do processo de neuroinflamação (Hryhorczuk *et al.*, 2013). A neuroinflamação ocorre em várias regiões encefálicas envolvidas na regulação de diferentes aspectos comportamentais, incluindo consumo alimentar e saciedade; mecanismos de prazer e recompensa; e níveis de energia, regulação do sono e humor. Disfunções nesses comportamentos são frequentemente observados em pessoas com depressão e também em

peças obesas, além de potencializar a inatividade e o ganho de peso, completando esse ciclo (Figura 2). Modelos experimentais com roedores descrevem que o aumento na expressão de citocinas, presente na obesidade, altera a modulação inflamatória afetando diferentes áreas cerebrais, as quais estão ligadas à regulação do humor e a formação de memórias como o córtex, hipotálamo, hipocampo (Dinel *et al.*, 2011; Pistell *et al.*, 2010).

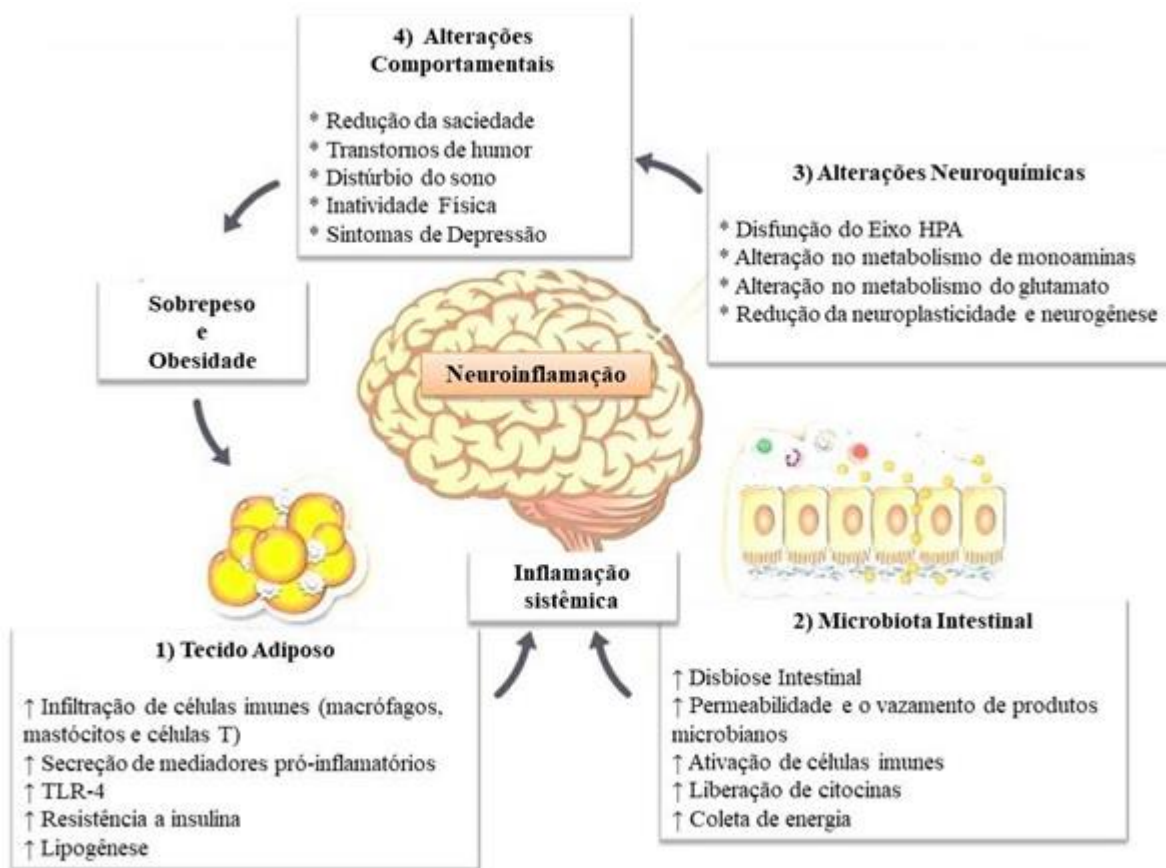


Figura 2: Ciclo inflamatório: Obesidade-Depressão. TLR-4 - Toll-like receptor 4; Eixo HPA – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Fonte: Adaptada de Ambrósio *et al.*, 2018

Desta forma este trabalho justifica-se pela importância do estudo quanto aos efeitos de dietas hipercalóricas em animais, mimetizando o comportamento humano, bem como sua relação com distúrbios de humor, como a ansiedade e a depressão, especialmente na população mais jovem. Ainda, é importante verificar se existe alteração na expressão de fatores de crescimento, como o BDNF, no hipocampo de ratos jovens que podem explicar, ao menos em parte, o aparecimento dos transtornos de humor.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e Dietas

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) sob o número 039/2017. Foram utilizados 20 ratos Wistar machos, provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), com peso aproximado de 200 gramas e 8 semanas de idade. Foram mantidos no Biotério da UNIPAMPA quatro animais por caixa, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, em condições de temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Os animais foram divididos em grupo dieta controle e dieta hipercalórica (HD), sendo avaliados por um período de 45 dias. No grupo controle ($n=08$), os animais receberam ração comercial balanceada (NUVITAL, NUVILAB-CR, PR, Brasil). O grupo HD ($n=12$) recebeu ração comercial acrescida de banha de porco e óleo de soja, nas proporções 0.75: 0.25: 1 (Reeves, 1997). Em ambos os grupos experimentais, os animais tinham acesso livre a água e comida, que foram trocadas em dias intercalados.

4.2 Avaliação da obesidade

Uma semana antes e semanalmente após o início do protocolo, os animais foram avaliados: (1) peso corporal (balança digital Elgin DP15 plus); (2) circunferência torácica (TC) – Fita métrica posicionada na linha perpendicular ao eixo longitudinal na altura da décima segunda vértebra torácica, última costela e processo esternal; e (3) comprimento naso-anal – Fita métrica posicionada na medida longitudinal do dorso do animal do nariz a base da cauda. Após a eutanásia dos animais, as gorduras perigonadal e retroperitoneal foram removidas, sempre pelo mesmo avaliador, e pesadas. Esse dado também foi usado para posterior mensuração do índice de adiposidade, soma do peso da gordura visceral/peso corporal x 100 (Taylor & Phillips, 1998).

4.3 Avaliação comportamental

No 43º dia após o início das dietas, os animais foram avaliados no labirinto em cruz elevado. Para tanto, o animal foi colocado no centro do labirinto e realizou-se a avaliação do

número de entradas e o tempo em que o animal permaneceu nos braços abertos por 5 minutos. Estes dados são utilizados como indicadores relacionados à ansiedade (Pellow *et al.*, 1985).

Também foi realizada a avaliação de aspecto tipo-depressivo, no 44º dia, através do teste de nado forçado. Esse teste consiste na exposição dos animais ao nado forçado em um tanque cilíndrico com água, a um nível que impeça o apoio das patas ou cauda no fundo do recipiente e a fuga pelas bordas superiores. A avaliação consistiu no tempo em que o animal permaneceu em uma postura de imobilidade por 6 minutos, indicativo de comportamento tipo-depressivo (Porsolt *et al.*, 1977).

4.4 Níveis de BDNF no Hipocampo

Após eutanásia, os hipocampos dos ratos foram retirados para dosagem de BDNF, utilizando método ELISA (Sales *et al.*, 2011). Para tanto, o tecido foi congelado a -80 °C até o ensaio. Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados em tampão contendo Tween 20, cloreto de benzetônio, ácido etilenodiaminotetracético - EDTA, albumina sérica bovina - BSA, NaCl, fluoreto de fenilmetanossulfonila e aprotinina. Os sobrenadantes foram processados usando ensaio imunoenzimático (ELISA) da R&D Systems (Minneapolis, MN), sendo que 100 µl da alíquota das amostras foram usadas, de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de BDNF foram estimados por interpolação de uma curva padrão por medidas colorimétricas a 450 nm (comprimento de onda de correção 540 nm) em um leitor de placas ELISA (Berthold Technologies - Apollo 8 - LB 912, KG, Alemanha). O teor de proteína total do sobrenadante foi medido usando o método de Bradford. (Schleicher & Wieland, 1978).

4.5 Testes bioquímicos

Foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca para realização dos testes bioquímicos de colesterol total, low density liprotein (LDL) e high density lipoprotein (HDL), triglicerídeos, glicose, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), conforme Kits específicos (Bioclin Quibasa).

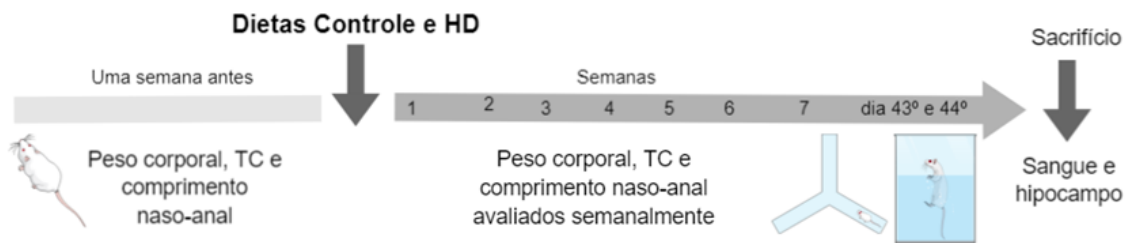


Figura 3: Design experimental. Os animais receberam dieta controle (ração comercial) ou dieta hipercalórica (HD). O peso corporal, a circunferência torácica (TC) e o comprimento naso-anal foram mensurados antes e semanalmente após o início das dietas. Nos dias 43 e 44 após o início das dietas foram realizados os testes comportamentais do labirinto em cruz e do nado forçado. Após as avaliações, os animais foram sacrificados, o sangue retirado para realização dos testes bioquímicos e o hipocampo para mensuração de BDNF.

4.6 Análise estatística

A análise estatística dos grupos experimentais foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA de duas via) com múltiplas comparações, ou teste de Student não pareado. Foi utilizado Software GraphPad (San Diego, CA, USA), sendo os dados expressos como média + erro padrão da média e o nível de significância em todos os casos foi considerado $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Podemos observar que os animais que receberam a dieta hipercalórica (grupo HD) apresentaram menor peso corporal, peso do fígado, circunferência torácica e comprimento naso-anal quando comparados ao grupo controle (Figura 4 A, C, D, E). No entanto, a dieta hipercalórica induziu o aumento de tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal, bem como, aumentou significativamente do índice de adiposidade (Figura 4 B e F).

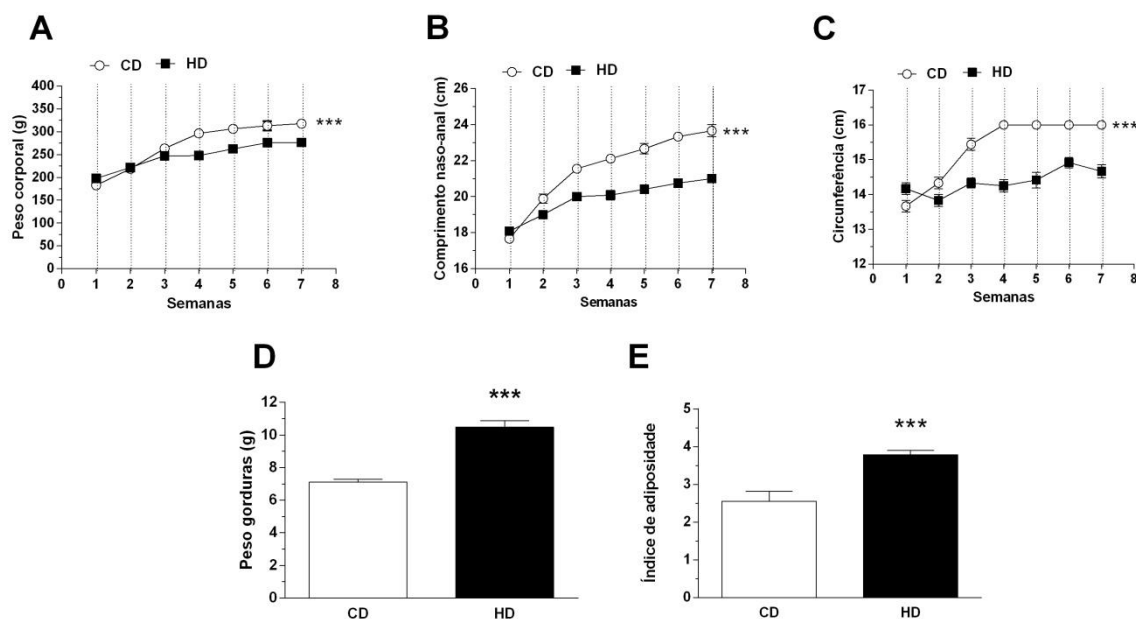


Figura 4: Avaliações da indução de obesidade durante e após os 45 dias de tratamento dos grupos dieta controle (CD), dieta hipercalórica (HD). A: peso corporal dos animais; B: comprimento naso-anal; C: circunferência torácica; D: peso das gorduras viscerais; E: índice de adiposidade (peso das gorduras viscerais/peso corporal x 100). (*) Figuras 2 A, B e C análise estatística usando ANOVA de duas vias com múltiplas comparações (***) $p < 0,0001$) e (*) Figuras 2 D e E análise estatística por test T não pareado (sendo (***) $p < 0,0001$ ou $p = 0,0003$, comparados ao grupo Controle).

Confirmando a indução da obesidade, podemos observar na avaliação bioquímica após 45 dias de dieta hipercalórica que houve um aumento significativo dos níveis séricos de colesterol total, LDL, HDL, glicose, triglicerídeos, ALT e AST no grupo HD, comparados aos animais do grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros bioquímicos após 45 dias de indução de obesidade dos grupos controle (CD) e dieta hipercalórica (HD)

Variáveis	Grupo Controle (n=8)	Grupo HD (n=12)	Diferença Estatística
Colesterol Total	58.25 ± 14.03	108.20 ± 19.55	p=0.0001***
LDL	32.34 ± 12.68	67.53 ± 19.22	p=0.0003***
HDL	25.91 ± 9.74	40.63 ± 0.97	p=0.0001***
Glicose	177.90 ± 23.69	285.40 ± 66.61	p=0.0009**
Triglicérides	43.83 ± 19.50	91.73 ± 29.07	p=0.0027**
ALT	57.88 ± 24.89	121.03 ± 25.94	p=0.0001***
AST	102.04 ± 22.46	239.30 ± 110.02	p=0.0030**

(*) Análise estatística usando test T não pareado, comparando grupo dieta hipercalórica (HD) ao grupo Controle (CD).

Após sete semanas de dieta hipercalórica, os animais foram avaliados no teste de nado forçado, onde podemos perceber um aumento do tempo de imobilidade nos animais do grupo HD, comparados aos animais do grupo controle (p= 0,0086), caracterizando um comportamento do tipo-depressivo (Figura 5 A). Ainda, os animais do grupo HD apresentaram perfil ansiogênico no teste do labirinto em cruz elevado, comparados aos animais do grupo controle, com significativa redução do tempo (p= 0,0029) e do número de entradas (p= 0,0141) nos braços abertos (Figura 5 B e C).

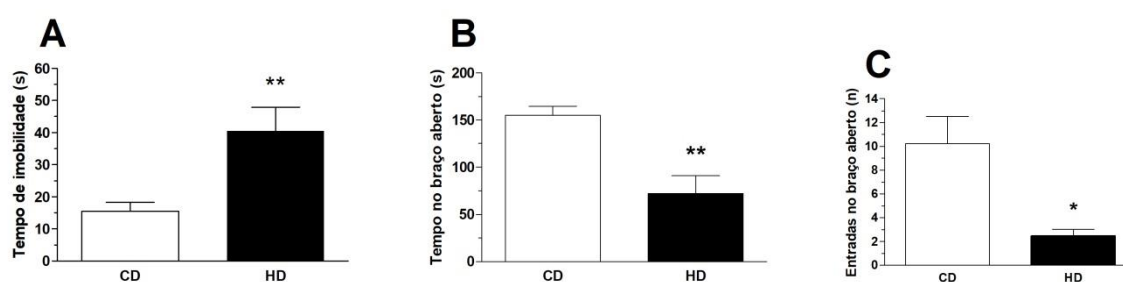


Figura 5: Efeitos da indução de obesidade por dieta hipercalórica comparada a dieta controle no perfil comportamental de depressão e ansiedade. A: Tempo de imobilidade durante o teste do nado forçado; B: Tempo de permanência dos animais nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado; C: número de entradas nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado. (*) Análise estatística usando test T não pareado (sendo *p<0,05 e **p<0,001), comparados ao grupo Controle.

Ao analisarmos a expressão de BDNF no hipocampo dos animais controle e HD, ao final do período de indução de obesidade, observa-se a redução significativa dos níveis de BDNF no grupo HD em comparação ao grupo Controle (Figura 6).

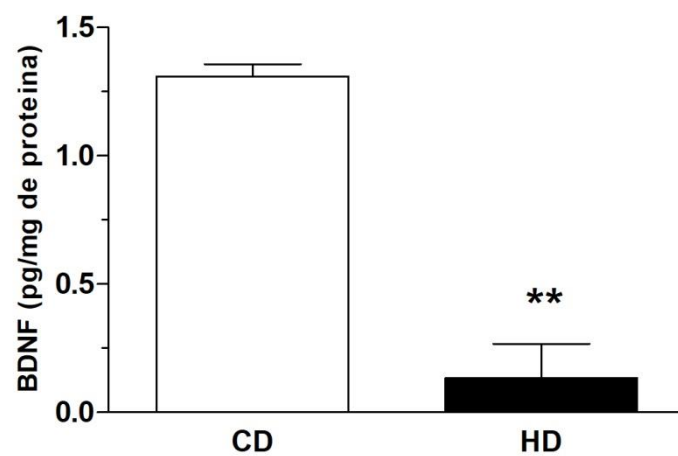


Figura 6: Expressão de BDNF no hipocampo dos animais do grupo controle e dieta hipercalórica após 45 dias de indução de obesidade. Análise estatística usando test T não pareado (sendo $**p < 0,001$), comparados ao grupo Controle.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, verificamos que os animais que receberam dieta hipercalórica por 45 dias apresentaram aumento na concentração de tecido adiposo e do índice de adiposidade de forma significativa. Ainda, os ratos tiveram elevação dos níveis de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, glicose, ALT e AST, caracterizando a indução de obesidade. Ademais, constatamos que os animais obesos apresentaram um comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso. A redução dos níveis de BDNF no grupo hipercalórico, podem explicar, pelo menos em parte, os resultados observados nos testes comportamentais indicando a presença de um perfil tipo-depressivo e ansioso.

Ao analisarmos o peso corporal observa-se que o grupo controle apresentou aumento significativo do peso quando comparado ao grupo HD. Estudos anteriores, verificaram que modelos de indução por dieta hipercalórica podem não induzir o aumento do peso de forma significativa em ratos (Pini *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2018). Além disso, o grupo HD também apresentou menor circunferência torácica e comprimento naso-anal sugerindo que a dieta rica em gordura afetou o desenvolvimento destes animais. Estes achados podem estar relacionados com o tipo de dieta hipercalórica usada no presente estudo, que pode não ser palatável para os animais, bem como, apresentar uma menor concentração de proteínas. Ozanne e colaboradores relataram que a restrição de proteína gera uma redução no crescimento de camundongos no início da vida, mesmo quando ofertado uma dieta palatável (Ozane *et al.*, 2004), ou seja, a falta de nutrientes pode ser um fator determinante nesse contexto.

Contudo, ao avaliar o peso total das gorduras e o índice de adiposidade, o grupo HD obteve um aumento significativo dessas variáveis comparado ao grupo controle. Ainda, em nosso estudo a dieta hipercalórica resultou no aumento significativo dos parâmetros bioquímicos analisados, resultando na indução de síndrome metabólica. Estes dados sugerem que o peso corporal não pode ser analisado como um fator isolado, pois, a dieta hipercalórica aumentou a concentração de tecido adiposo e promoveu alterações metabólicas. Na literatura vários estudos suportam este achado, os quais, concluem que o aumento da adiposidade acarreta em disfunções como como a dislipidemia, hiperglicemia, dano hepático, além de, gerar distúrbios significativos no sistema endócrino (Oliveira *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016).

As alterações geradas pela dieta hipercalórica, especialmente a dislipidemia, hiperglicemia e o dano hepático, refletem uma série de alterações metabólicas que podem

estar interligados. Neste contexto, alguns estudos indicam que a resistência à insulina poderia estar ligada ao acúmulo de tecido adiposo no fígado. Além disso, acredita-se que em níveis elevados os lipídeos podem inativar componentes de sinalização da insulina, resultando assim, em uma possível resistência tecidual (Arkan *et al.*, 2005; Holland *et al.*, 2007; Yu-Sheng *et al.*, 2018).

Goodman e Whitaker (2002) realizaram um estudo envolvendo 9000 adolescentes do 7º ao 12º ano, onde demonstraram que ao longo de um ano acompanhando esses indivíduos, a relação de depressão e obesidade foi alta. Ainda, verificaram que o humor deprimido está associado a um aumento do risco de desenvolvimento e persistência da obesidade desses adolescentes (Goodman & Whitaker, 2002). Com base nos resultados dos testes comportamentais, após 7 semanas de indução de obesidade o grupo HD apresentou um perfil tipo-depressivo e ansiogênico. Desta forma, podemos inferir que existe uma relação entre o aumento da concentração de tecido adiposo e possíveis alterações neurobiológicas como transtornos de humor (André *et al.*, 2014). De forma semelhante, Yamada *et al.*, após 16 semanas de indução de obesidade por dieta hipercalórica, verificou a indução de um comportamento tipo-depressivo nos animais, o qual foi associado a disfunções metabólicas e há um possível dano inflamatório gerado pelo excesso de tecido adiposo (Yamada *et al.*, 2011). Além disso, Ferreira *et al.*, observou em seu estudo o surgimento de um comportamento ansiogênico, após 8 semanas de indução de obesidade, usando dieta de Cafeteria em ratos. Sweeney *et al.* verificou a mesma alteração após 15 semanas de dieta rica em gordura em camundongos (Ferreira *et al.*, 2018; Sweeney *et al.*, 2017). Os nossos resultados diferenciam-se dos demais supracitados pelo reduzido tempo de indução de obesidade, menor que 8 semanas, e que já foi suficiente para gerar alterações metabólicas, bioquímicas e comportamentais nos animais. De fato, o preciso mecanismos celular e molecular, bem como as interações comportamentais que medeiam a relação entre obesidade, depressão e ansiedade permanecem obscuros e são pouco estudados. No entanto, sabe-se que o ganho de peso excessivo pode causar disfunção em estruturas cerebrais responsáveis pela cognição e emoção, incluindo o hipocampo, importante estrutura relacionada a comportamentos de humor e memória (Park *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014).

Dietas ricas em gordura podem reduzir a neurogênese hipocampal em adultos (Hwang *et al.*, 2008), assim como o montante de BDNF nesse local (Park *et al.*, 2010). O BDNF é um importante fator neurotrófico que desempenha um papel fundamental na sobrevivência e orientação dos neurônios durante o desenvolvimento, e é necessário para a sobrevivência e

funcionamento normal de neurônios no encéfalo adulto (Malberg *et al.*, 2000). O BDNF promove a plasticidade neural, neurogênese, sobrevivência neuronal e crescimento de neuritos (Thoenen, 1995). Observamos, no atual estudo, que os animais apresentaram uma redução significativa dos níveis de BDNF no hipocampo quando consumiam uma dieta rica em gorduras. É importante salientar que esses animais receberam a dieta ainda jovens, e que durante a infância e adolescência as dietas alimentares podem promover danos neurais que afetam diretamente a neurogênese e conseqüentemente o desenvolvimento cognitivo (Fu *et al.*, 2017; Boitard *et al.*, 2012). Seria interessante verificar as alterações de memória desses animais a longo prazo, no entanto, podemos inferir que a redução dos níveis de BDNF estão relacionados com os problemas de humor encontradas neste trabalho. A diminuição dos níveis de BDNF pode levar a uma perda de plasticidade e também ao dano e morte de neurônios que estão envolvidos na fisiopatologia da depressão e ansiedade (Malberg *et al.*, 2000). Liu e colaboradores, verificaram que uma diminuição na gordura corporal ou na glicose no sangue, por si só, não está associada à redução dos níveis de leptina ou na expressão de BDNF no núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) em ratos (Liu *et al.*, 2014). Eles também verificaram que uma dieta rica em gordura não modifica a expressão de BDNF nos estágios iniciais do desenvolvimento da obesidade em ratos, parecendo ser uma consequência a longo prazo deste tipo de dieta. Os animais que permaneceram com a dieta por 4 semanas apresentaram maior adiposidade e menores níveis de BDNF (Liu *et al.*, 2014), sugerindo que componentes de gordura da dieta e seus metabólitos podem regular diretamente a transcrição / pós-transcrição gênica e sistemas de segundos mensageiros (Liu *et al.*, 2014). Além deste, outros estudos (Hargrave *et al.*, 2016; Yeomans, 2017; Kanoski *et al.*, 2007) mostram evidências significativas quanto a relação da dieta hipercalórica na redução dos níveis de BDNF, por disfunção do hipocampo, com conseqüente alterações cognitivas e humorais.

De fato, compreender as vias neurobiológicas e determinantes socioambientais compartilhados pelas alterações de humor, como a depressão, e a obesidade podem ajudar na prevenção e tratamento de condições crônicas, associando os antecedentes da vida precoce do indivíduo e o potencial de morbidade a longo prazo dessas doenças (Goodman & Whitaker, 2002). Uma vez instalada, os tratamentos da obesidade e da depressão são muito difíceis. Autores indicam que o estresse contínuo, que pode começar na primeira infância, poderia estar ligado a um ambiente social hostil, levar a alterações na morfologia cerebral e nos eixos neuroendócrinos causando a obesidade e distúrbios de humor (Gohil *et al.*, 2001; Goodman & Whitaker, 2002). Neste contexto, terapias que diminuam a ansiedade e a depressão (como

ansiolíticos, antidepressivos, psicoterapia e terapias complementares e alternativas) podem ser usadas no tratamento e prevenção da obesidade em jovens.

7 CONCLUSÃO

Com base no exposto podemos verificar que após 7 semanas de dieta hipercalórica houve o aumento da concentração de tecido adiposo, com significativo aumento do índice de adiposidade em ratos jovens. Além disso, os animais apresentaram alterações nos parâmetros bioquímicos condizentes com o desenvolvimento de síndrome metabólica.

Além de promover a alteração nos adipócitos, a dieta hipercalórica prejudicou o crescimento e desenvolvimento dos ratos. Ademais, nossos resultados demonstram que a redução de BDNF no hipocampo pode estar associada ao aumento do tecido adiposo, gerado pelo consumo de dieta hipercalórica, o que induziu um comportamento tipo-depressivo e antigênicos nos ratos que receberam a dieta rica em gordura quando jovens.

8 REFERÊNCIAS

1. ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M.A.; GORDON, J.A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. **Neuron.**, v. 65, p. 257-269, 2010.
2. AKBARALY, T.N. *et al.* Dietary pattern and depressive symptoms in middle age. **The British Journal of Psychiatry**, v. 195, p. 408-413, 2009.
3. AMBRÓSIO, G. *et al.* Depression and peripheral inflammatory profile of patients with obesity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 9, n.1, p. 132-141, 2018.
4. ANDRÉ, C. Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: Focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 41, p. 10-21, 2014.
5. ARKAN, M.C. *et al.* IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nat Med.**, v. 11, p. 191–198, 2005.
6. ATTUQUAYEFIO, T. *et al.* A four-day Westernstyle dietary intervention causes reductions in hippocampal-dependent learning and memory and interoceptive sensitivity. **PLoS One**, v. 12, e0172645, 2017.
7. BAKER, K. D. *et al.* The impact of obesity and hypercaloric diet consumption on anxiety and emotional behavior across the lifespan. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 83, p. 173-182, 2017.
8. BLOKHIN, I. O.; LENTZ, S. R. Mechanisms of thrombosis in obesity. **Current Opinion in Hematology**, v. 20, n. 5, p. 437-444, 2013.
9. BLÜHER, M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 27, p. 163-177, 2013.
10. BLÜHER, M. Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? **Clinic Science**, v. 130, p. 1603-1614, 2016.
11. BOITARD, C. *et al.* Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. **Hippocampus**, v. 22, p. 2095-2100, 2012.
12. BOLDRINI, M. *et al.* Benzodiazepines and the potential trophic effect of antidepressants on dentate gyrus cells in mood disorders. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 17, p. 1923-1933, 2014.

13. CASTANON, N.; LASSELIN, J.; CAPURON, L. Neuropsychiatric comorbidity in obesity: role of inflammatory processes. **Front Endocrinol**, v. 15, p. 5-74, 2014.
14. CLINGMAN C.C., RYDER S.P. Metabolite sensing in eukaryotic mRNA biology. **Wiley Interdiscip. Ver. RNA.**, v. 4, p. 387-396, 2013.
15. de WIT, L. *et al.* Depression and obesity: a meta-analysis of community-based studies. **Psychiatry Res.**, v.178, n. 2, p. 230 – 235, 2010.
16. DINEL, A.L. *et al.* Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. **PLoS One**, v. 6, n. 9, e24325, 2011.
17. DREBER, H. *et al.* Mental distress in treatment seeking young adults (18–25 years) with severe obesity compared with population controls of different body mass index levels: cohort study. **Clin. Obes.**, v. 7, p. 1-10, 2017.
18. DUMAN, R.S.; MONTEGGIA, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol. Psychiatry**, v. 59, p. 1116-1127, 2006.
19. FERREIRA, A. *et al.* Cafeteria-diet effects on cognitive functions, anxiety, fear response and neurogenesis in the juvenile rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 155, p. 197-207, 2018.
20. FU, Z. *et al.* Long-term high-fat diet induces hippocampal microvascular insulin resistance and cognitive dysfunction. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 312, p. 89-97, 2017.
21. FUCHS, E. *et al.* Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 14, p. 481-490, 2004.
22. GARIEPY, G.; NITKA, D.; SCHMITZ, N. The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. **Int J Obesity.**, v. 34, n. 3, p. 407-419, 2010.
23. GOODMAN, E., WHITAKER, R. A prospective study of the role of depression in the development and persistence of adolescent obesity. **Pediatrics.**, v. 110, n. 3, p. 497-504, 2002.
24. HARDY, O.T.; CZECH, M.P.; CORVERA, S. What causes the insulin resistance underlying obesity? **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 19, p. 81-87, 2012.
25. HARGRAVE, S.L.; JONES, S.; DAVIDSON, T.L. The outward spiral: a vicious cycle model of obesity and cognitive dysfunction. **Curr. Opin. Behav. Science**, v. 9, p. 40-46, 2016.

26. HARRIS, R.B.; APOLZAN, J.W. Changes in glucose tolerance and leptin responsiveness of rats offered a choice of lard, sucrose, and chow. **American journal of physiology. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 302, p. 1327-1339, 2012.
27. HOFFMAN, E.L.; VONWALD, T.; HANSEN, K. The Metabolic Syndrome. **S D Med.**; edição especial, p. 24-28, 2015.
28. HOHN, A. *et al.* Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. **Nature**, v. 344, p. 339-341, 1990.
29. HOLLAND, W.L. *et al.* Lipid mediators of insulin resistance. **Nutr Rev.**, v.65, p. 39-46, 2007.
30. HRYHORCZUK, C.; SHARMA, S.; FULTON, S.E. Metabolic disturbances connecting obesity and depression. **Front Neurosci, Out.** 2013. doi: 10.3389/fnins.2013.00177.
31. HWANG, I.K. *et al.* Seong, Strain-specific differences in cell proliferation and differentiation in the dentate gyrus of C57BL/6N and C3H/HeN mice fed a high fat diet. **Brain Res.**, v. 1241, p. 1-6, 2008.
32. JACKA, F.N. *et al.* A prospective study of diet quality and mental health in adolescents. **PloS one**, v. 6, e24805, 2011.
33. JOHNSON, A. R.; MILNER, J. J.; MAKOWSKI, L. The inflammation highway: Metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 218–238, 2012.
34. KANOSKI, S.E. *et al.* The effects of energy-rich diets on discrimination reversal learning and on BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 182, p. 57-66, 2007.
35. KASEN, S. *et al.* Obesity and psychopathology in women: a three decade prospective study. **Int J Obes.**, v. 32, n. 3, p. 558-66, 2008.
36. Kaufmann, F.N. *et al.* NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: Clinical and preclinical findings. **Brain Behav Immun.**, v. 64, p. 367-383, 2017.
37. KERNIE, S.G; LIEBL, D.J.; PARADA, L.F. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. **EMBO J.** v. 19, p. 1290-300, 2000.
38. KIM, H.K. *et al.* Neuropathological relationship between major depression and dementia: a hypothetical model and review. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 67, p. 51-57, 2016.

39. KLOP, B.; ELTE, J.W.F.; CABEZAS M.C. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. **Nutrients**, v.5, p.1218-1240, 2013.
40. KOHLBOECK, G. *et al.* Food intake, diet quality and behavioral problems in children: results from the GINI-plus/LISA-plus studies. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 60, p. 247-256, 2012.
41. KRABBE, K.S. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, p. 431-438, 2007.
42. LARSEN, M.H. *et al.* Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. **J. Psychiatr. Res.**, v. 44, p. 808-816, 2010.
43. LEE, T. *et al.* Allowing animals to bite reverses the effects of immobilization stress on hippocampal neurotrophin expression. **Brain Res.**, v. 1195, p. 43-49, 2008.
44. LEIBROCK, J. *et al.* Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. **Nature**, v. 341, p. 149-152, 1989.
45. LIU, X. *et al.* Effects of energy status and diet on Bdnf expression in the ventromedial hypothalamus of male and female rats. **Physiol. Behav.**, v. 10, n. 130, p. 99-107, 2014.
46. LOPRESTI, A.L.; DRUMMOND, P.D. Obesity and psychiatric disorders: commonalities in dysregulated biological pathways and their implications for treatment. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 45, p. 92-99, 2013.
47. LUO, L.; LIU, M. Adipose tissue in control of metabolism. **J. Endocrinol**, v. 231, p. 77-99, 2016.
48. LUPPINO, F.S. *et al.* Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 67, n. 3, p. 220-229, 2012.
49. MALBERG, J.E. *et al.* Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurosci**, v. 20, n. 24, p. 9104-9110, 2000.
50. MALBERG, J.E.; SCHECHTER, L.E. Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs. **Curr. Pharm. Des.**, v. 11, n. 2, p. 145-155, 2005.
51. MALETIC, V. *et al.* Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. **Int J Clin Pract.**, v. 61, n. 12, p. 2030-2040, 2007.

52. MANSUR, R.B.; BRIETZKE, E.; MCINTYRE, R.S. Is there a “metabolic mood syndrome”? A review of the relationship between obesity and mood disorders. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 52, p. 89-104, 2015.
53. MARTINOWICH, K.; MANJI, H.; LU, B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. **Nat. Neurosci.**, v. 10, p. 1089-1093, 2007.
54. MEEK, T.H. *et al.* BDNF action in the brain attenuates diabetic hyperglycemia via insulin-independent inhibition of hepatic glucose production. **Diabetes**, v. 62, p.1512-1518, 2013.
55. NAIR, A. *et al.* Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, p. 1504-1519, 2007.
56. NEEDHAM, B. *et al.* Trajectories of change in obesity and symptoms of depression: the cardia study. **Am J Public Health.**, v. 100, n. 6, p. 1040-1046, 2010.
57. NOBLE, E.E. *et al.* The lighter side of BDNF. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 300, p. 1053–69, 2011.
58. OLIVEIRA, M.C. *et al.* Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate- containing diet in mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 9, p. 396-406, 2013.
59. OZANE, S.E. *et al.* Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. **Clinical Science**, v. 106, p. 141-145, 2004.
60. PADILLA-COREANO, N. *et al.* Direct ventral hippocampal– prefrontal input is required for anxiety-related neural activity and behavior. **Neuron.**, v. 89, p. 857-866, 2016.
61. PAGLIASSOTTI, M.J. *et al.* Endoplasmic reticulum stress in obesity and obesity-related disorders: an expanded view. **Metabolism**, v. 65, p. 1238-1246, 2016.
62. PARK, H.R. *et al.* A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. **Neurosci Lett.**, v. 482, n. 3, p.235-239, 2010.
63. PELLEYMOUNTER, M.A. *et al.* Characteristics of BDNF-induced weight loss. **Exp. Neurol.**, v. 131, n. 2, p. 229-238, 1995.
64. PELLOW, S. *et al.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods.**, v. 14, p. 149-167, 1985.

65. PINI, R.T. *et al.* Effects of cafeteria diet and high fat diet intake on anxiety, learning and memory in adult male rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 7, p. 396-408, 2017.
66. PISTELL, P.J. *et al.* Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. **J. Neuroimmunol.**, v. 219, n. 1-2, p. 25-32, 2010.
67. PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioural despair in mice: A primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de thérapie.**, v. 229, p. 327-336, 1977.
68. PRADO, W.L. *et al.* Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. **Rev Bras Med Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378-383, 2009.
69. PRICE, J.L., DREVETS, W.C. Neurocircuitry of Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology REVIEWS**, v. 35, p. 192-216, 2010.
70. REEVES, P.G. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. **J Nutr.**, v. 127, n 5, p. 838-841, 1997.
71. REICHELT, A. C. Dietary induced obesity disrupts trace fear conditioning and decreases hippocampal reelin expression. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 43, p. 68-75, 2015.
72. REICHELT, A.C. *et al.* Impact of adolescent sucrose access on cognitive control, recognition memory, and parvalbumin immunoreactivity. **Learn. Mem.**, v. 22, p. 215-224, 2015.
73. RIDDER, S. *et al.* Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. **J. Neurosci.** v. 29, n. 26, p. 6243-6250, 2005.
74. ROBINSON, M.J. *et al.* 2015. Individual differences in cue-induced motivation and striatal systems in rats susceptible to diet-induced obesity. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 9, p. 2113-2123, 2015.
75. ROSINI, T. C; SILVA, A. S. R.; MORAES C. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. **Rev Assoc Med Bras.** v. 58, p.383-387, 2012.
76. SALES, A. J. *et al.* Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors. **Br J Pharmacol.**, v. 164, n. 6, p. 1711-1721, 2011.

77. SAMPEY, B. P. *et al.* Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**, v. 19, p. 1109-1117, 2011.
78. SANCHEZ-VILLEGAS, A. *et al.* Fast-food and commercial baked goods consumption and the risk of depression. **Public Health Nutrition**, v. 15, p. 424-432, 2012.
79. SANTOS, C.J. *et al.* Carbohydrate-enriched diet predispose to anxiety and depression-like behavior after stress in mice. **Nutritional Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 33-39, 2016.
80. SCHMIDT, H.D.; SHELTON, R.C.; DUMAN, R.S. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 2375-2394, 2011.
81. SCHWENK, R. W.; VOGEL, H.; SCHURMANN, A. Genetic and epigenetic control of metabolic health. **Mol Metab.**, v. 2, p. 337-347, 2013.
82. SELBOM, K.S.; GUNSTAD, J. Cognitive function and decline in obesity. **J. Alzheimers Dis.**, v. 30, n. 2, p. 89-95, 2012.
83. SHALEV, I. *et al.* BDNF Val66Met polymorphism is associated with HPA axis reactivity to psychological stress characterized by genotype and gender interactions. **Psychoneuroendocrinology.**, v. 34, n. 3, p. 382-388, 2009.
84. SILVA, I. Importance of emotional regulation in obesity and weight loss treatment. **Fractal, Rev Psicol.**, v. 27, n. 3, p. 286-290, 2015.
85. SWEENEY, P. *et al.* HFD-induced energy states-dependent bidirectional control of anxiety levels in mice. **International Journal of Obesity**, v. 41, p. 1237–1245, 2017.
86. TAYLOR, B.A.; PHILLIPS, S.J. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. **Genomics.**, v. 34, n. 3, p. 389-398, 1996.
87. THOENEN, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. **Science**, v. 270, p. 593-598, 1995.
88. THOMPSON RAY, M. *et al.* Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. **J. Psychiatry Neurosci.**, v. 36, p. 195-203, 2011.
89. TRAJKOVSKA, V. *et al.* Whole blood BDNF levels in healthy twins discordant for affective disorder: association to life events and neuroticism. **J Affect Disord.**, v. 108, n. 1-2, p.165-169, 2008.

90. WENSVEEN, F. M. *et al.* The "Big Bang" in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 9, p. 2446-2456, 2015.
91. YAMADA, N. *et al.* Impaired CNS leptin action is implicated in depression associated with obesity. **Endocrinology**, v. 152, n. 7, p. 2634-2643, 2011.
92. YAMADA-GOTO, N. *et al.* Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice. **J. Neuroendocrinol**, v. 24, n. 8, p. 1120-1125, 2012.
93. YEOMANS M.R. Adverse effects of consuming high fat-sugar diets on cognition: implications for understanding obesity. **Proc, Nutr, Soc.**, v. 76, n. 4, p. 455-465, 2017.
94. YU-SHENG, S. *et al.* Fisetin Attenuates Metabolic Dysfunction in Mice Challenged with a High-Fructose Diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 31, p. 8291–8298. 2007.

9 ANEXO I

Certificado de aprovação de protocolo para uso de animais em pesquisa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11 640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200. E-mail: ceua@unipampa.edu.br



CEUA
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 039/2017

Título: Investigação de diferentes dietas hipercalóricas sobre o perfil nociceptivo de ratos com obesidade.

Data da aprovação: 25/09/2017

Período de vigência do projeto: 25/09/2019

Pesquisadores(a): Morgana Duarte da Silva

Campus: Uruguaiiana

Telefone: (48) 9956-0610

E-mail: morganasilva@unipampa.edu.br



CEUA

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	48
Peso/Idade	300 g / 2 a 3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria.



Prof. Dr. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA