



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Tese de Doutorado

MODELO DE OBESIDADE E ESTRESSE CRÔNICO EM RATOS WISTAR: AVALIAÇÃO
DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR, DE ANEDONIA E DE NÍVEIS CENTRAIS DE BDNF

Isabel Cristina de Macedo

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

MODELO DE OBESIDADE E ESTRESSE CRÔNICO EM RATOS WISTAR: AVALIAÇÃO DO
COMPORTAMENTO ALIMENTAR, DE ANEDONIA E DE NÍVEIS CENTRAIS DE BDNF

Isabel Cristina de Macedo

Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

Coorientadora: Prof. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor
em Fisiologia.

Porto Alegre, 2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu que mais este objetivo fosse alcançado e que tem guiado a mim e a minha família em todos os momentos.

À minha adorada filha Ana Carolina e ao meu marido Cléo. À minha filha por ser a realização do meu maior sonho, e ao meu marido por ser meu grande incentivador, acreditar nos meus projetos e por ser um pai maravilhoso e um marido companheiro e amigo.

À minha amada mãe Maria Deni, por ser essa mulher forte e maravilhosa que apesar de estar longe se faz presente a cada momento; ao meu querido pai Christiano e à minha avó Eva (*in memoriam*), que fazem muita falta em nossas vidas. À minha querida irmã Maribel, por ser a pessoa mais doce que eu conheço, aos meus amados sobrinhos (Marina, Camille, Roberto e Fernanda) e aos demais familiares pelo apoio e amor que me dedicam.

Em especial a minha orientadora, Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres, profissional dedicada e competente, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e compartilhar seus dias e seus conhecimentos comigo. Por me ensinar a pensar como pesquisadora, a estudar sempre, a não desistir nunca e principalmente por dar exemplos que servirão para sempre. Por ser a grande incentivadora de seus orientandos e buscar incessantemente contribuir para nosso crescimento profissional e pessoal. E principalmente por ser digna de nosso respeito, admiração e carinho.

À minha coorientadora Prof^a Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro, por ter aceitado esta coorientação e por todas as orientações dados nos momentos em que foi minha professora.

Aos queridos colegas do grupo de pesquisa, Aléxi, Andressa, Carla, Cleverson, Daniela, Éllen, Gabriela, Joice, Joanna, Jonnsin, Lauren, Liciane, Paulo, Sonia, Stefânia, Vanessa, Vinícius e Yasmine, pela ajuda nos experimentos e por terem compartilhado comigo momentos de alegria, estresse, cansaço, mas também de muitas realizações. E também ao Rafael, à Etiane e ao Fabrício, pelo companheirismo e carinho.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pelo conhecimento agregado à minha formação. Aos funcionários do PPG, Diego, Vanessa e Daniele, em especial a querida Alice, que será pra sempre a minha querida secretária.

À secretária Ieda e à técnica Tania do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, pelo carinho e amizade.

A toda a equipe da UEA/HCPA, em especial a chefe da unidade enfermeira Marta Cioatto, que não mede esforços pra atender aos pesquisadores e faz dessa unidade um modelo a ser copiado.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa, ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo financiamento e apoio ao projeto.

*Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades
para a sua própria produção ou a sua construção.*

Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Obesidade.....	15
1.2 Obesidade e controle do apetite.....	17
1.3 A Influência dos padrões alimentares atuais na obesidade.....	20
1.4 O estresse crônico e sua influência na depressão e no controle alimentar.....	21
1.5 O papel do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na depressão e no controle alimentar.....	24
2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	28
3 HIPÓTESES DE TRABALHO.....	30
3.1 Hipótese 1.....	30
3.2 Hipótese 2.....	30
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo geral.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
4.2.1 Objetivos específicos do primeiro protocolo experimental.....	31
4.2.2 Objetivos específicos do segundo protocolo experimental.....	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5.1 Primeiro protocolo experimental.....	32
5.2 Segundo protocolo experimental.....	32
5.3 Tamanho de amostra.....	33
5.4 Modelo de obesidade.....	34
5.5 Modelo de estresse crônico por restrição.....	34
5.6 Delta de peso e consumo calórico (kcal).....	34
5.7 Teste de campo aberto.....	35
5.8 Teste do labirinto em cruz elevado.....	35
5.9 Avaliação do comportamento hiperfágico.....	36
5.10 Morte dos animais e coleta das amostras.....	36
5.11 Avaliação dos níveis de BDNF por ELISA.....	37
5.12 Avaliação do dano e viabilidade celular (LDH e MTT) em hipocampo.....	37
5.13 Análise estatística.....	38
5.14 Considerações éticas.....	38
6 RESULTADOS DO PRIMEIRO PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	39
6.1 Avaliação do consumo calórico (kcal) ao longo do tempo e do comportamento hiperfágico após jejum de 24h.....	39

6.2 Delta de Peso (g)	40
6.3 Teste de campo aberto e do labirinto em cruz elevado	41
6.4 Avaliação dos níveis de BDNF, (LDH) e (MTT).....	43
7 MANUSCRITO SUBMETIDO E ARTIGO PUBLICADO.....	46
7. 1 Primeiro protocolo experimental	46
7.1.1 Manuscrito submetido ao <i>Neuroscience Journal</i>	46
7.2 Segundo protocolo experimental	70
7.2.1 Artigo publicado no <i>Neuropeptides Journal</i>	70
8 DISCUSSÃO	77
CONCLUSÃO.....	83
PERSPECTIVAS	83
Referências	85
Demais produções	95
Anexos.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- α -MSH - hormônio α -melanócito-estimulante ou melanotropina (do inglês *α -melanocyte stimulating hormone*)
- ACTH - hormônio adrenocorticotrófico (do inglês *adrenocorticotropic hormone*)
- AgRP - peptídeo relacionado ao gene agouti (do inglês *agouti-related protein*)
- BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)
- CAMK - Ca²⁺/ calmodulina-dependente da proteína quinase (do inglês *Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase*)
- CART - transcrito relacionado à cocaína e anfetamina (do inglês *cocaine and amphetamine related transcript*)
- CREB - proteína de resposta ao cAMP (do inglês *cAMP response element-binding*)
- CCK - colecistoquinina
- CRH - hormônio liberador de corticotropina (do inglês *corticotropin-releasing hormone*)
- DAG - diacilglicerol
- ECA - do inglês *enter closed arms*
- ELISA - do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*
- EOA - do inglês *enter open arms*
- ERK - quinase regulada por sinais extracelulares (do inglês *extracellular-signal-regulated kinases*)
- GCs - glicocorticoides
- GLP1 - peptídeo semelhante ao glucagon (do inglês *glucagon-like peptide*)
- HDM ou DMH - hipotálamo dorsomedial (do inglês *dorsomedial hypothalamus*)
- HHA eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
- HL ou LH - hipotálamo lateral (do inglês *lateral hypothalamus*)
- IP3 - fosfatidilinositol-3-quinase
- LDH - lactato desidrogenase
- NArc - núcleo arqueado (do inglês *arcuate nucleus*)
- NPHD - do inglês *non protect hand dipping*
- NPV ou PVN - núcleo paraventricular (do inglês *paraventricular nucleus*)
- NPY - neuropeptídeo Y

NVM ou VMN - núcleo ventromedial (do inglês *ventromedial nucleus*)

POMC - pró-opiomelanocortina

RMC ou MC4R - receptor de melanocortina (do inglês *melanocortin 4 receptor*).

NTS - núcleo do trato solitário

PHD - do inglês *protect hand dipping*

PYY - peptídeo YY

SNC - sistema nervoso central

TrkB - receptor de tropomiosina relacionada à quinase B

PLC γ - fosfolipase C gama

PKB (Akt) - do inglês *protein kinase B*

PP - polipeptídeo pancreático

RG - receptor de glicocorticoide

TOA - do inglês *time open arms*

TCA - do inglês *timer closed arms*

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

NaCl - cloreto de sódio

CaCl₂ - cloreto de cálcio

MgSO₄ – sulfato de magnésio

HEPES - 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid

KH₂PO₄ - fosfato de potássio monobásico

MTT - [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

DMSO – dimetil sulfóxido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resultados do estudo Global Burden Disease, 2013.	16
Figura 2. Controle central e periférico do apetite.	19
Figura 3. Ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) em resposta ao estresse.	22
Figura 4. Vias de sinalização do BDNF que resultam na expressão de proteínas relacionadas à sobrevivência celular, crescimento neuronal e neuroplasticidade.....	25
Figura 5. Ação do estresse na redução dos níveis de BDNF e no volume do hipocampo.....	26
Figura 6. BDNF e o controle central do apetite.....	27
Figura 7. Primeiro desenho experimental.	32
Figura 8. Segundo desenho experimental.	33
Figura 9. Consumo calórico (kcal) ao longo das 6 semanas de tratamento.....	39
Figura 10. Avaliação de 12h de consumo de ração padrão e água após 24h de jejum.....	40
Figura 11. Diferença entre o peso final e o peso inicial dos animais em estudo (delta de peso).	41
Figura 12. Níveis de BDNF em tecido hipocampo.....	43
Figura 13. Avaliação de dano celular pela liberação de LDH em tecido hipocampo.....	44
Figura 14. Avaliação da viabilidade celular pelo MTT em tecido hipocampo.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comportamentos avaliados no teste de campo aberto.....	42
Tabela 2. Comportamentos avaliados no labirinto em cruz elevado.....	42

RESUMO

A obesidade tornou-se um dos mais graves problemas de saúde pública em todo o mundo, e o aumento na ingestão de alimentos hipercalóricos tem contribuído significativamente para o desenvolvimento desta doença. Este distúrbio metabólico pode ocasionar diversas outras comorbidades. Por outro lado, o estresse crônico, seja associado à obesidade ou não, leva a diferentes alterações neuroendócrinas e psicológicas. Estruturas cerebrais, especialmente o hipotálamo, estão envolvidas no controle do apetite. Atualmente, o hipocampo também tem sido associado ao controle do consumo alimentar. Neste contexto, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que é amplamente expresso em todas as regiões do cérebro e desempenha um papel importante na sobrevivência neuronal e na neuroplasticidade tem sido associado à regulação da homeostase energética e da ingestão alimentar. Assim, o objetivo desta tese foi investigar os efeitos da obesidade induzida por dieta hipercalórica sobre parâmetros neuroquímicos e comportamentais com base em dois protocolos experimentais. No primeiro protocolo experimental, 30 ratos Wistar adultos foram divididos igualmente em 2 grupos de acordo com modelo de dieta: grupo controle, que recebeu ração padrão, e grupo dieta de cafeteria, alimentado com dieta de cafeteria. O objetivo do protocolo experimental foi investigar os efeitos da obesidade induzida por dieta hipercalórica em parâmetros neuroquímicos e comportamentais. Foram avaliados ganho de peso, comportamento hiperfágico, comportamento do tipo ansioso e atividade locomotora no labirinto em cruz elevado e no aparato de campo aberto, respectivamente. Também foram avaliados os níveis de BDNF e a susceptibilidade ao dano induzido por H_2O_2 com liberação de lactato desidrogenase (LDH) em tecido hipocampal. Foi possível observar que a exposição à dieta de cafeteria durante 6 semanas resultou em obesidade, hiperfagia e aumento na atividade locomotora. Animais obesos mostraram diminuição dos níveis de BDNF e aumento da susceptibilidade a danos celulares no hipocampo. As alterações comportamentais em resposta à exposição à dieta de cafeteria podem ser relacionadas com os seus efeitos neuroquímicos no cérebro, e a deficiência na regulação do apetite (hiperfagia) que pode estar associada à perda de integridade do hipocampo. No segundo protocolo experimental, 32 ratos Wistar adultos foram divididos igualmente em 4 grupos de acordo com a dieta hipercalórica (modelo de dieta de cafeteria) e modelo de estresse crônico por restrição: grupo controle que recebeu dieta padrão; grupo estresse que foi exposto ao modelo de estresse crônico por restrição; grupo dieta hipercalórica, que recebeu a dieta hipercalórica e grupo estresse + dieta hipercalórica, que foi exposto ao modelo de estresse crônico por restrição e recebeu dieta hipercalórica. O objetivo foi avaliar o efeito da obesidade associada com o estresse crônico sobre os níveis centrais de BDNF. O peso do animal e a ingestão calórica foram empregados como parâmetros de obesidade enquanto o peso relativo da glândula adrenal foi empregado como parâmetro de estresse. Demonstrou-se que o estresse crônico por restrição, por 12 semanas, aumenta o peso da glândula adrenal, diminui os níveis de BDNF no hipocampo e está associado com decréscimo na ingestão de sacarose, caracterizando anedonia. O aumento na glândula adrenal demonstra a intensa estimulação desta estrutura. A diminuição no consumo de sacarose associada à diminuição do BDNF hipocampal pode sugerir um comportamento depressivo. Por outro lado, os ratos que receberam a dieta hipercalórica tiveram aumento na ingestão

de calorias e tornaram-se obesos, resultado que foi associado a uma diminuição dos níveis de BDNF hipotálamo.

Palavras-chave: Anedonia; BDNF; depressão, dieta de cafeteria; estresse crônico; hiperfagia; hipocampo; hipotálamo; obesidade.

ABSTRACT

Obesity has become one of the most serious worldwide public health problems and increment on hypercaloric food intake has contributed significantly to the development this disease. This metabolic disorder can lead to various other comorbidities. On other hand chronic stress, whether associated with obesity or not, leads to different neuroendocrine and psychological changes. Brain structures, especially hypothalamus, are involved in food control. Currently the hippocampus also has been associated with energy intake. In this context, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) that is widely expressed in all brain regions and plays an important role in neural survival and neuroplasticity has been implicated in the regulation of energy homeostasis and food intake. Thus, the aim of this thesis was to investigate the effects of hypercaloric diet-induced obesity associated or not to chronic stress by restriction on neurochemical and behavioral parameters based on two experimental protocols. In first experimental protocol 30 Wistar adults rats were equally divided on two groups according to diet model: control group that received standard rat chow and cafeteria diet group that received cafeteria diet model. The aim of the experiment protocol was to investigate the effects of hypercaloric diet-induced obesity on neurochemical and behavioral parameters. Were evaluated the weight gain, hyperphagic behavior, and the anxiety-like behavior and locomotor activity on Plus Maze and the Open Field tests, respectively. Were evaluated also the BDNF levels and susceptibility to H₂O₂-induced oxidative damage with LDH release of hippocampal tissue. In this experimental protocol was possible to observe that exposure to the cafeteria diet for six weeks resulted in obesity, hyperphagia and increased on locomotor activity. Obese animals showed decreased BDNF levels and increased susceptibility to cellular damage in the hippocampus. The behavioral consequences of exposure to the cafeteria diet may be related to its biochemical effects on the brain and impairments food intake regulation (hyperphagia) might be associated to the loss of hippocampal integrity. In second experimental protocol 32 Wistar adults rats were divided on four groups according to hypercaloric diet (cafeteria diet model) and chronic restraint stress model: (C) control total group that received standard rat chow; (S) stress group that was exposure to chronic restraint stress model and received standard rat chow; (HD) group that received hypercaloric diet and (SHD) stress group that was exposure to chronic restraint stress model and received hypercaloric diet. The aims of experimental protocol were to evaluate the effect of obesity associated with chronic stress on the BDNF central levels of rats. Obesity was controlled by analyzing the animals' caloric intake and changes in body weight. As a stress parameter, was analyzed the relative adrenal gland weight. This experimental protocol demonstrated that chronic restraint stress for 12 weeks increased the weight of the adrenal gland, decrease BDNF levels in the hippocampus and is associated with a decrease in sucrose intake, characterized anhedonia. The increase in the adrenal gland demonstrates the intense stimulation of this structure. The decrease in the consumption of sucrose associated with decreased hippocampal BDNF may suggest a depressive behavior. On the other hand, mice that received hypercaloric diet had an increased caloric intake and became obese, which was associated with a decrease in BDNF levels hypothalamus.

Keywords: Anhedonia; BDNF; cafeteria diet; chronic stress; depression; hippocampus; hyperphagia; hypothalamus; obesity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

O aumento da prevalência de sobrepeso e de obesidade observado nas últimas décadas em todo o mundo constitui um importante problema de saúde pública, considerado por muitos pesquisadores como uma pandemia (Swinburn, Sacks et al. 2011; Popkin, Adair et al. 2012), que preocupa órgãos de saúde pública no mundo inteiro. As crescentes taxas de obesidade e sobrepeso têm gerado preocupação também no meio científico e por isto têm sido foco de um grande número de relevantes estudos de prevalência. Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas também na busca de novas alternativas farmacológicas e não farmacológicas que possam auxiliar na prevenção e tratamento deste transtorno metabólico ao redor do mundo.

Um estudo de prevalência conhecido como *Global Burden Disease* publicado na revista *The Lancet* em parceria com *World Health Organization*, envolvendo 188 países de diferentes regiões do mundo, mostra um intenso crescimento nas taxas de sobrepeso e obesidade. O estudo aponta que, no período entre 1980 e 2013, a obesidade e o sobrepeso cresceram aproximadamente 28% entre adultos e 47% entre crianças. Em números absolutos, isto significa um aumento de 857 milhões de indivíduos em 1980 para 2,1 bilhões em 2013. O relatório mostra ainda que aproximadamente 30% da população mundial está obesa, sendo que em torno de 50% dos obesos do mundo vivem em apenas 10 países (Estados Unidos, China, Índia, Rússia, Brasil, México, Egito, Alemanha, Paquistão e Indonésia) onde o Brasil aparece como quinto colocado no *ranking* dos países avaliados (Ng, Fleming et al. 2014) conforme mostra a Figura 1. Corroborando o estudo de Ng e colaboradores, dados nacionais colhidos pela “vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico” do Ministério da Saúde mostram que, em 2012, 51% da população brasileira estava acima do peso (54% homens; 48% mulheres). Em Porto Alegre este percentual chegava a 54% (59,9% homens; 49,3% mulheres). Foi considerado com excesso de peso o indivíduo com Índice de Massa Corporal (IMC) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ (Ministério da Saúde, 2012), uma vez que o sobrepeso e a obesidade são definidos por um IMC ≥ 25 e IMC ≥ 30 respectivamente (Mei, Grummer-Strawn et al. 2002).

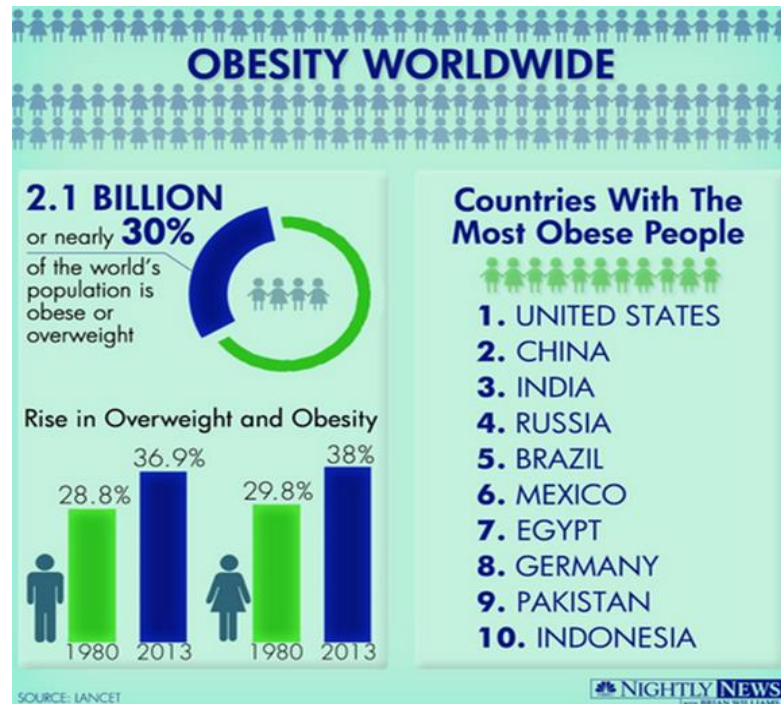


Figura 1: Resultados do estudo *Global Burden Disease*, 2013. Este estudo de prevalência acompanhou as taxas de obesidade no período de 1980 a 2013 que mostra o Brasil em quinto lugar em número de pessoas obesas no mundo (Figura obtida no site da NBC *Nightly News*: <http://www.nbcnews.com/nightly-news/infographic-obesity-skyrockets-across-globe-n116996> First published May 28th 2014, 10:15 pm; acesso em 25 de fevereiro de 2015).

A crescente preocupação com o aumento nas taxas de obesidade prende-se ao fato de que esta doença está associada a diversas outras comorbidades e a altos índices de mortalidade (Despres, Lemieux et al. 2008). Em torno de 3,4 milhões de adultos morrem a cada ano como resultado de excesso de peso; além disto, o sobrepeso e a obesidade são importantes fatores de risco para doenças como diabetes, coronariopatias, depressão, doenças neurodegenerativas, transtornos musculoesqueléticos e determinados tipos de câncer (WHO, 2015) e (de Wit, Luppino et al. 2010; Luppino, de Wit et al. 2010; Keller, Xu et al. 2011). Alterações genéticas identificadas nas últimas décadas são reconhecidamente importantes no desenvolvimento de obesidade (Waalén 2014). Além de fatores genéticos, estamos expostos a um “ambiente obesogênico” (Ng, Fleming et al. 2014; Williams, Scarborough et al. 2014) que favorece um balanço energético positivo, situação em

que o consumo supera o gasto energético, elevando o nível de gordura corporal e desencadeando obesidade (Hebebrand, Hinney et al. 2013).

1.2 Obesidade e controle do apetite

Definida como um acúmulo de tecido adiposo, a obesidade resulta principalmente do desequilíbrio energético entre as calorias ingeridas e as calorias gastas. A regulação da homeostase energética e a manutenção do peso corporal estável dependerão da adequada integração entre sinais periféricos e centrais responsáveis pelo controle alimentar (Schwartz and Porte 2005). Diversos hormônios e peptídios, já identificados, atuam na sinalização periférica e central do controle alimentar. Estas moléculas são sintetizadas em diversos tecidos, como estômago, pâncreas, intestino, tecido adiposo e sistema nervoso central (Lutter and Nestler 2009; Murray, Tulloch et al. 2014). Alterações em sua síntese, liberação ou sinalização irão influenciar de forma significativa a ingestão alimentar e o equilíbrio energético, podendo desencadear compulsão alimentar e obesidade.

O hipotálamo é considerado o centro de integração das informações periféricas e centrais referentes ao controle da alimentação. Estas informações são processadas nos diversos núcleos hipotalâmicos, incluindo o núcleo arqueado (NArc, do inglês *arcuate nucleus*), o núcleo paraventricular (PVN, do inglês *paraventricular nucleus*), o núcleo ventromedial (VMN, do inglês *ventromedial nucleus*), o hipotálamo dorsomedial (DMH, do inglês *dorsomedial hypothalamus*) e o hipotálamo lateral (LH, do inglês *lateral hypothalamus*) (Kalra, Dube et al. 1999; Rios 2011). Dois grupos de neurônios adjacentes localizados no núcleo arqueado do hipotálamo sintetizam e liberam neuropeptídios orexígenos e anorexígenos em resposta a sinais procedentes de tecidos periféricos e centrais (Kalra, Dube et al. 1999; Cowley, Smart et al. 2001; Horvath, Diano et al. 2001). Dentre estas moléculas, o neuropeptídio Y (NPY) e o peptídio relacionado ao gene agouti (AgRP, do inglês *agouti-related protein*) são potentes peptídios orexígenos e anabólicos. Por outro lado, a pró-opiomelanocortina (POMC), que dá origem ao hormônio α -melanócito-estimulante, também conhecida como melanotropina (α -MSH, do inglês *α -melanocyte stimulating hormone*) e ao transcrito relacionado à cocaína e anfetamina (CART, do inglês *cocaine and amphetamine related transcript*), apresenta potente ação anorexígena e catabólica (Schwartz and Porte 2005; Morton, Cummings et al. 2006; Sohn 2015). A presença de colaterais axonais entre esses dois grupos de neurônios permite a inibição recíproca entre eles. Ambas as populações neuronais (orexígenas e anorexígenas) projetam-

se para neurônios do PVN que apresenta uma densa população de neurônios que expressam o receptor de melanocortina (MC4R, do inglês *melanocortin 4 receptor*). Os peptídeos α -MSH e CART (derivados da POMC), liberados de neurônios anorexígenos no NArc, ligam-se ao MC4R no PVN desencadeando sinalização de saciedade, resultando numa redução na ingestão alimentar concomitante com o aumento do gasto energético. O AgRP é um agonista inverso no MC4R, levando a um aumento da ingestão alimentar (Figura 2) (Woods and D'Alessio 2008; Vetter, Faulconbridge et al. 2010) e (Damiani, 2010).

Muitos peptídeos e hormônios periféricos atuam no hipotálamo, dentre os mais vastamente estudados, a leptina liberada pelo tecido adiposo e a insulina liberada pelo pâncreas estimulam neurônios anorexígenos (POMC/ α -MSH/CART) e inibem neurônios orexígenos (NPY/AgRP); o peptídeo YY (PYY) liberado pelo intestino (cólon) também inibe neurônios orexígenos (Sahu, Dube et al. 1995; Jequier 2002; Sainsbury, Cooney et al. 2002; Ahima 2006). Dessa forma, tanto leptina, insulina e PYY (Nguyen, Herzog et al. 2011) ativam os neurônios POMC e inibem neurônios NPY levando a redução na ingestão alimentar e ao aumento do gasto energético. Já a grelina, um importante hormônio gástrico, atua estimulando neurônios orexígenos, desencadeando o início da refeição e diminuindo o gasto energético (Kageyama, Takenoya et al. 2010; Nogueiras, Williams et al. 2010). Outros sinais aferentes de saciedade vindos do trato digestório pela divisão parassimpática e entérica do sistema nervoso vegetativo através do nervo vago são direcionados ao hipotálamo e também contribuem para o controle alimentar (Schwartz and Gelling 2002; Goldstone 2006; Schwartz, Azzara et al. 2013) e (Bear 2008). É importante salientar também que o próprio alimento, com suas características organolépticas, influencia o controle da ingestão alimentar, assim como informações detectadas através dos nutrientes constantes no alimento. A presença do alimento no estômago resulta em distensão e estiramento, que são detectados por terminações aferentes (ou sensoriais) na parede gástrica ativando os reflexos vagovagais enviados através de neurônios do núcleo do trato solitário (NTS), que irá influenciar no tamanho da refeição (Woods and D'Alessio 2008). Podem ser citados também outros inúmeros peptídeos e hormônios que atuam na sinalização do controle da ingestão alimentar, tais como colescítocinina, peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), oxintomodulina e bombesina liberados pelo intestino; resistina, adiponectina, vinfastina e apelina liberados pelo tecido adiposo; e polipeptídeo pancreático, glucagon e bombesina liberados pelo pâncreas entre outros ainda em estudo (Damiani et al. 2010).

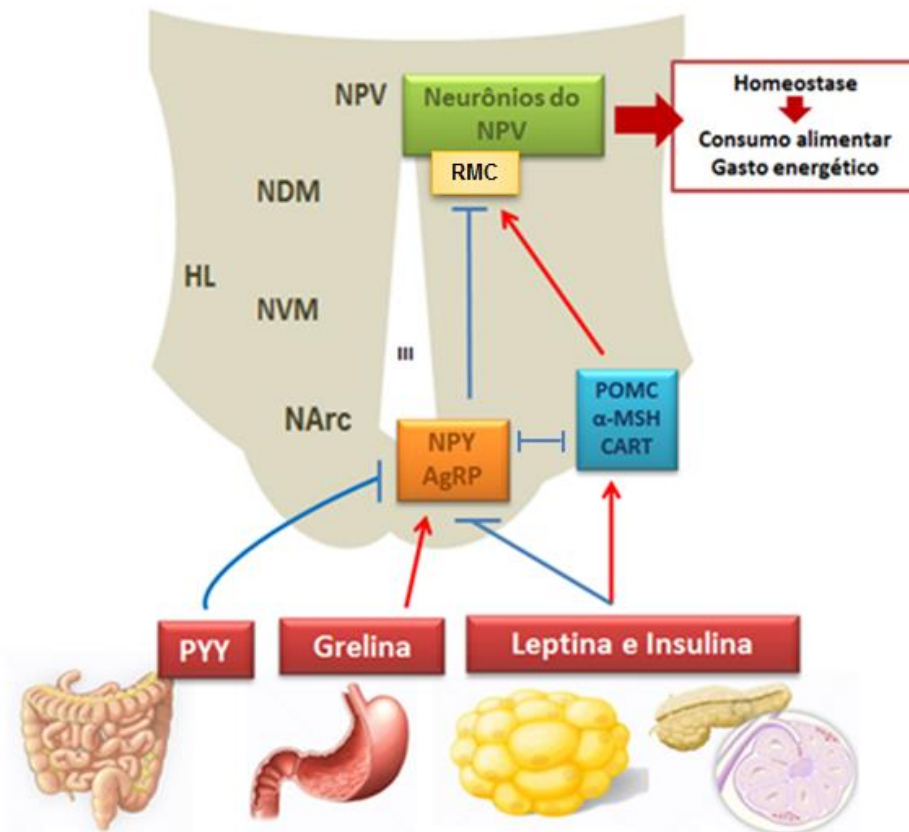


Figura 2. Controle central e periférico do apetite. A figura mostra o hipotálamo com o terceiro ventrículo (III) identificado ao centro para facilitar a localização dos núcleos. A metade esquerda da figura mostra a distribuição dos núcleos hipotálâmicos, enquanto a metade direita descreve parcialmente a sinalização periférica e central do controle do apetite mostrando a sinalização pelo PYY, grelina, leptina e insulina. NPV: núcleo paraventricular do hipotálamo; HDM: hipotálamo dorso medial; HL: hipotálamo lateral; NVM: núcleo ventro-medial do hipotálamo; NArc: núcleo arqueado do hipotálamo; RMC: receptor de melanocortina; POMC: pró-opiomelanocortina; α -MSH: hormônio α -melanócito estimulante; CART: transcrito relacionado a cocaína e a anfetamina; PYY: polipeptídeo YY; NPY: neuropeptídeo Y; AgRP: peptídeo relacionado a gene *agouty*; CCK: colecistoquinina; GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon (do inglês *glucagon-like peptide*); PP: polipeptídeo pancreático (Figura elaborada pela autora; crédito das imagens adaptadas à figura ao site: <http://www.centralx.es>).

Com base na complexidade do controle alimentar, seria simplista pensar que uma única estrutura no sistema nervoso central (SNC) poderia estar envolvida neste processo. Além do

hipotálamo, inúmeras outras estruturas cerebrais estão envolvidas neste controle, dentre elas o hipocampo particularmente focado nesta tese. Esta estrutura, classicamente envolvida com aprendizagem e memória, apresenta vias comuns a hormônios periféricos relacionados com o apetite (grelina e leptina) e intensa comunicação com o hipotálamo (Lathe 2001; Lenard and Berthoud 2008). Alterações na neurogênese tanto do hipotálamo como do hipocampo podem ocorrer na presença de obesidade (Stangl and Thuret 2009; Bouret 2010; McNay, Briancon et al. 2012). Ao longo da última década, pesquisadores começaram a identificar os fatores que podem relacionar a obesidade com a neurogênese hipotalâmica ou hipocampal no adulto (Yon, Mauger et al. 2013). Tem sido sugerido que a neurogênese no hipocampo adulto associa metabolismo energético com processos cognitivos a fim de regular o peso corporal atuando como uma interface entre a função hipotalâmica e hipocampal (Vaynman and Gomez-Pinilla 2006; Park and Lee 2011).

1.3 A Influência dos padrões alimentares atuais na obesidade

O consumo alimentar é resultado das necessidades do organismo, mas também é influenciado por características relacionadas ao alimento, como paladar, textura e composição nutricional (Blundell, Lawton et al. 1996; Macdiarmid, Cade et al. 1996). Sinais periféricos e humorais são enviados ao SNC, com informações sobre características do alimento e quantidade de alimentação ingerida (Broberger 2005).

Importantes modificações no padrão alimentar humano surgiram nas últimas décadas com o aumento acentuado da ingestão de alimentos industrializados, ricos em gordura e sacarose, conhecidos como *palatable food* ou *comfort food* (Richardson, Boone-Heinonen et al. 2011; Popkin, Adair et al. 2012; Monteiro, Moubarac et al. 2013). Alguns fatores foram determinantes para a mudança dos hábitos alimentares, entre eles o drástico aumento no consumo de *fast foods* e de alimentos com altos teores de açúcar e gordura como bolos, biscoitos, pizza e refrigerantes entre outros (Cook, Rutishauser et al. 2001; Rangan, Randall, et al. 2008; Rangan, Schindeler et al. 2009). O consumo destes alimentos é impulsionado principalmente pela sua disponibilidade, alta palatabilidade e baixo custo (Drewnowski and Greenwood 1983; Drewnowski 2000), estas características os tornam altamente consumidos por jovens e crianças que fazem refeições fora de suas casas (Popkin 2006; Piernas and Popkin 2011).

É de se que considerar também que o atual padrão de vida e o estresse imposto ao cotidiano das pessoas contribuíram de forma decisiva para que as refeições tradicionais fossem substituídas por refeições que proporcionam maior praticidade e rapidez. Com isto, alimentos industrializados que dispensam um menor tempo de preparo e apresentem alta durabilidade foram ganhando cada vez mais adeptos (Willians, 1997) e foram modificando drasticamente os padrões alimentares. Este padrão alimentar é conhecido com *Western style diet* e pode ser exemplificado pela dieta de cafeteria, modelo animal de obesidade empregado nesta tese, que é composta por alimentos com alta palatabilidade e alto conteúdo calórico, mas pobre em valor nutricional (Sampey, Vanhoose et al. 2011; Macedo, Medeiros et al. 2012; de Oliveira, Scarabelot et al. 2014).

Dessa forma, a ingestão de alimentos altamente energéticos, ricos em açúcares refinados e em gordura saturada induz hiperfagia, que associada ao sedentarismo característico da vida moderna e a predisposições genéticas, contribui de forma significativa para as crescentes taxas de obesidade no mundo (Kanoski and Davidson 2011). Diversos estudos atribuem a este tipo de dieta a capacidade de estimular o sistema de recompensa aumentando o prazer relacionado com a comida, alterando vias de sinalização no SNC (dopaminérgica, serotoninérgica, opioidérgica, endocanabinóide entre outras) levando à perda da capacidade do hipotálamo controlar adequadamente o apetite (Blundell, Lawton et al. 1995; Lawton, Wales et al. 1995; Erlanson-Albertsson 2005; Bessesen 2011; Kenny 2011).

1.4 O estresse crônico e sua influência na depressão e no controle alimentar

A resposta ao estresse inclui a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) levando à liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH) por neurônios do núcleo PVN do hipotálamo no sistema porta hipofisário. O CHR liga-se a receptores na hipófise e desencadeia a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea, que por sua vez estimula a síntese e liberação de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) a partir do córtex da glândula adrenal. Os efeitos celulares dos glicocorticoides são mediados pelos receptores do tipo glicocorticoide e mineralocorticoide que atuam em diversos tecidos mobilizando recursos energéticos do corpo. O controle do eixo HHA ocorre por retroalimentação negativa sobre o hipotálamo, e a hipófise, por ação de hormônios secretados no próprio eixo (Bear, 2008), conforme mostra a Figura 3. Outras regiões do cérebro, como o hipocampo, também atuam no controle do HHA, pois possuem receptores glicocorticoides, desta forma o hipocampo também está envolvido em finalizar as

respostas ao estresse, diminuindo a liberação de glicocorticoides. Estudos demonstram que lesões no hipocampo podem prolongar a secreção de corticosterona e/ou de ACTH, após a exposição ao estresse, mas estas respostas são estresse específicas (Herman, Figueiredo et al. 2003). Ao mesmo tempo, o estresse também desencadeia a ativação do sistema nervoso simpático com liberação das catecolaminas epinefrina e norepinefrina da medula adrenal (Chrousos 2009).

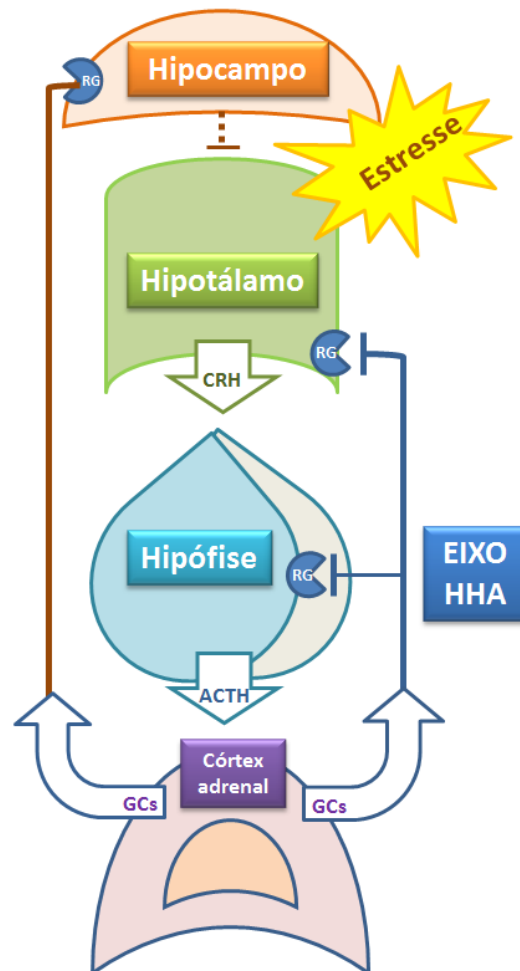


Figura 3. Ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) em resposta ao estresse. RG: receptor glicocorticoide, CRH: hormônio liberador de corticotrofina (do inglês *corticotropin releasing hormone*); ACTH: hormônio adrenocorticotrófico (do inglês *adenocorticotropic hormone*); GCs: glicocorticoides (Figura elaborada pela autora).

As respostas neuroquímicas desencadeadas pelo estresse podem levar a alterações comportamentais, imunológicas, metabólicas, bem como a doenças cardiovasculares e do SNC como

depressão (Gobinath, Mahmoud et al. 2014; Contoreggi 2015). O estresse crônico envolve alterações prolongadas na atividade neuro-hormonal que pode levar à dessensibilização dos sistemas de retroalimentação do eixo HHA, podendo resultar em elevação de cortisol/corticosterona, sub-regulação de receptores adrenérgicos (epinefrina, norepinefrina) e perda da ritmicidade circadiana hormonal (de Oliveira, Scarabelot et al. 2014; Contoreggi 2015).

O estresse, ao elevar os níveis de glicocorticoides, pode induzir mudanças na organização sináptica do hipocampo com inibição da neurogênese (Schoenfeld and Gould 2012) contribuindo com a atrofia da arborização dendrítica e redução do número de sinapses (McEwen 1999; Kim, Song et al. 2006; Park, Lee et al. 2015). De forma similar, os mecanismos propostos para o estabelecimento de depressão envolvem alterações na estrutura e neurogênese no hipocampo (Banasr and Duman 2007; Shansky and Morrison 2009; Blugeot, Rivat et al. 2011) associadas ou não a alterações nos níveis de neurotrofinas, (Autry and Monteggia 2012), sugerindo um papel crucial do hipocampo na depressão. Cabe citar que o fenômeno clínico de depressão envolve outros neurotransmissores responsáveis também pela regulação do humor, ansiedade, medo, sistema de recompensa, atenção, motivação e funções neurovegetativas (Pilar-Cuellar, Vidal et al. 2013), além de alterações na neurotransmissão glutamatérgica cortical (Witkin, Marek et al. 2007) que não foram foco desta tese.

O paradigma de estresse crônico é um dos modelos animais mais largamente empregados no estudo da depressão (Strekalova, Kholod et al. 2011) e pode induzir anedonia, um embotamento da capacidade de sentir prazer que está relacionada ao comportamento depressivo (Strekalova, Spanagel et al. 2004; Briones, Gagno et al. 2012; Der-Avakian and Markou 2012), desencadeado provavelmente por uma incapacidade de perceber recompensa (van Heesch, Prins et al. 2013). Em animais de experimentação o comportamento anedônico pode ser avaliado através do consumo de sacarose (Willner, Towell et al. 1987).

A exposição a estresse crônico também influencia o comportamento alimentar em diferentes graus, conforme o tipo de estressor (Oliver and Wardle 1999; Gibson 2006; Dallman 2010; Yau and Potenza 2013), e pode desencadear o aumento do consumo de alimentos palatáveis induzindo obesidade, ou ainda a diminuição do apetite, levando à perda de peso (Cartwright, Wardle et al. 2003; Adam and Epel 2007; Tryon, Carter et al. 2013). Sugere-se que este mecanismo envolva a modulação de peptídios orexígenos e anorexígenos (Jastreboff, Potenza et al. 2011; Rothman and Mattson 2013). Níveis elevados de glicocorticoides podem aumentar a ingestão de alimentos ricos em

gordura e açúcar que, por sua vez, são capazes de modular a intensidade da resposta ao estresse, diminuindo a liberação de CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo e os níveis plasmáticos de ACTH e de cortisol (Duman 2014). Além disso, o estresse crônico pode alterar os níveis séricos de leptina (Macedo, Medeiros et al. 2012; de Oliveira, Scarabelot et al. 2014) interferindo assim na regulação do apetite e na homeostase energética (Wang, Wang et al. 2008).

1.5 O papel do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na depressão e no controle alimentar

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) é uma neurotrofina largamente expressa no SNC e periférico (Leibrock, Lottspeich et al. 1989; Hohn, Leibrock et al. 1990). Através da manutenção da arborização dendrítica e consolidação sináptica, esta neurotrofina está classicamente relacionada com sobrevivência neuronal, diferenciação, neuroplasticidade e memória (Bramham and Messaoudi 2005; Sossin and Barker 2007; Lu, Christian et al. 2008; Novkovic, Mittmann et al. 2015). Resumidamente, o BDNF sinaliza por meio do receptor de tropomiosina relacionada à quinase B (TrkB) ativando fosfolipase C gama com produção de diacilglicerol (DAG) e fosfatidilinositol-3-quinase (IP3). O aumento da concentração de DAG induz influxo de cálcio, enquanto IP3 induz liberação de cálcio de estoques citoplasmáticos, ambos contribuindo para a elevação do cálcio intracelular. O aumento de cálcio intracelular participa da fosforilação de proteínas que atuam em cascatas de sinalização intracelular, como a Akt/PKB (PKB, do inglês *protein kinase B*), uma rota de sinalização importante para a sobrevivência celular; a Ca²⁺/calmodulina-dependente da proteína quinase (CAMK, do inglês *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase*) importante via de plasticidade celular; e a quinase regulada por sinais extracelulares (ERK, do inglês *extracellular-signal-regulated kinases*) envolvida com sobrevivência celular, no crescimento neuronal e na neuroplasticidade. Enquanto CAMK e ERK ativam a transcrição de BDNF através da proteína de resposta ao cAMP (CREB, do inglês *cAMP response element-binding*), Akt/PKB atua na sobrevivência neuronal (Sossin and Barker 2007; Duman and Voleti 2012) e na plasticidade sináptica (Cunha, Brambilla et al. 2010), Figura 4. Alterações nas vias de sinalização afetando enzimas responsáveis pela fosforilação/defosforilação ou transcrição de proteínas têm sido associadas a sintomas depressivos. Estudos recentes mostram que o bloqueio da sinalização de ERK produz comportamentos depressivos e de ansiedade, e que a sinalização desta proteína está reduzida em

modelos de estresse crônico. Além disso, estudos *post mortem* relataram diminuição dos níveis de ERK e Akt/PKB no hipocampo de pacientes suicidas deprimidos (Duman and Voleti 2012).

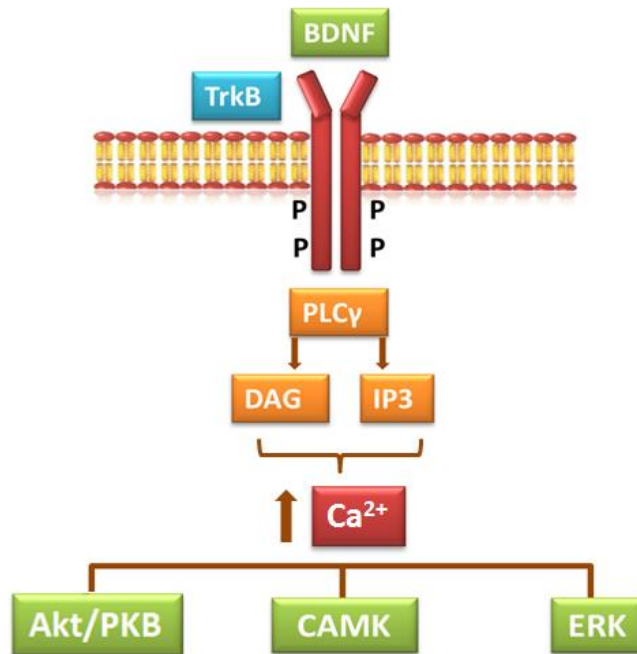


Figura 4. Vias de sinalização do BDNF que resultam na expressão de proteínas relacionadas à sobrevivência celular, ao crescimento neuronal e neuroplasticidade. BDNF: *brain derived neurotrophic factor*; TrkB: *tropomyosin-related kinase B*; PLCγ: *phospholipase C gama*; DAG: diacilglicerol; IP3: inositol trifosfato; Akt/PKB: *protein kinase B*; CAMK: *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase*; ERK: *extracellular-signal-regulated kinases* (Figura elaborada pela autora).

Esta tese aborda dois importantes aspectos relacionados ao BDNF. Primeiro, a hipótese da neuroplasticidade da depressão relacionada à diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo (Malberg and Schechter 2005; Duman and Monteggia 2006). Estudos demonstram que o aumento da expressão de BDNF no hipocampo (Tamburella, Micale et al. 2009; Pascual-Brazo, Castro et al. 2012) induz efeitos antidepressivos (Duman, Heninger et al. 1997; Duman, Malberg et al. 1999; Calabrese, Molteni et al. 2009; Taliaz, Loya et al. 2011). A exposição ao estresse induz o aumento nos níveis de glicocorticoides, que inibe a transcrição de BDNF por inibição de CREB (Berton and Nestler 2006). Este mecanismo levaria à redução do volume do hipocampo devido à diminuição na

neurogênese, retração dendrítica e perda de células gliais, conforme mostra a Figura 5 (Campbell and Macqueen 2004).

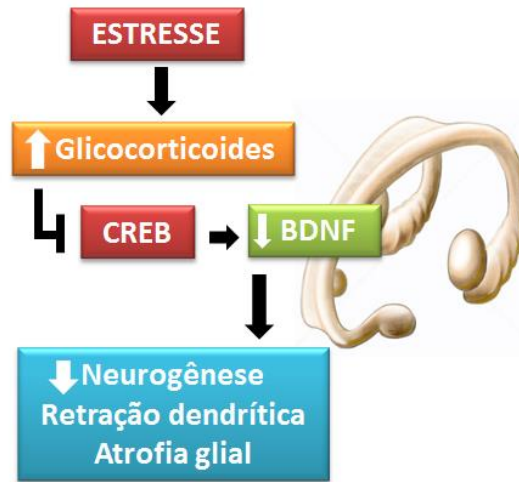


Figura 5. Ação do estresse na redução dos níveis de BDNF e no volume do hipocampal. O aumento na concentração de glicocorticóides no estresse inibe CREB e a consequente transcrição de BDNF. BDNF: do inglês *brain derived neurotrophic factor*; CREB: do inglês *cAMP response element-binding*. (Figura elaborada pela autora; crédito da imagem adaptada à figura ao site: <http://www.centralx.es>).

Em situações de estresse, a expressão do BDNF é modulada por uma variedade de sistemas de neurotransmissores e neuromoduladores (Tyler, Alonso et al. 2002; Lu, Christian et al. 2008). Antidepressivos que modulem alguns destes sistemas podem aumentar a arborização dendrítica e a expressão de BDNF em neurônios hipocampais, melhorando os sintomas depressivos (Berton and Nestler 2006).

O segundo aspecto relacionado ao BDNF discutido nesta tese é o seu papel na ingestão alimentar e no controle de peso. O BDNF e seu receptor TrkB são expressos em vários centros reguladores do apetite, como os núcleos do hipotálamo envolvidos na modulação do balanço energético (Rios 2011; Rios 2014) e no controle do peso corporal (Wang, Godar et al. 2010). Figura 6. Lesões no núcleo ventromedial do hipotálamo, onde o BDNF é altamente expresso (Kernie, Liebl et al. 2000), desencadeiam hiperfagia e obesidade semelhantes às de ratos deficientes em leptina (Yu, Wang et al. 2009). Por outro lado, a administração intracerebroventricular de BDNF reduz o consumo de energia e o peso corporal (Pelley, Mounter, Cullen et al. 1995), diminuindo a hiperfagia e a obesidade em animais geneticamente deficientes de BDNF (Kernie, Liebl et al. 2000). Em humanos,

os polimorfismos genéticos para o BDNF e mutações do gene que codifica seu receptor TrkB estão associados a alterações no controle alimentar e obesidade (Yeo, Connie Hung et al. 2004; Beckers, Peeters et al. 2008; Burns, Schmidt et al. 2010). Estes achados sugerem que o BDNF auxilia no controle do peso corporal (Wang, Godar et al. 2010), atuando na modulação de vias hipotalâmicas controladas por neurônios orexígenos e anorexígenos (Rothman, Griffioen et al. 2012; Rios 2013). O papel do BDNF no controle alimentar está relacionado à sua interação com outras moléculas envolvidas neste processo, como a leptina, a insulina, a melanocortina, o hormônio liberador da corticotropina (CRH) e o neuropeptídeo Y (NPY). Um mecanismo proposto para ação do BDNF no controle alimentar é a interação BDNF-leptina que pode levar à supressão do apetite; supõe-se que a leptina induza a tradução local de mRNA para BDNF em dendritos de neurônios hipotalâmicos (Liao, An et al. 2012). Em situação de obesidade esta sinalização fica comprometida devido à resistência central à leptina, alterando o controle do apetite e o balanço do gasto energético (Bohm, Ordelheide et al. 2012).

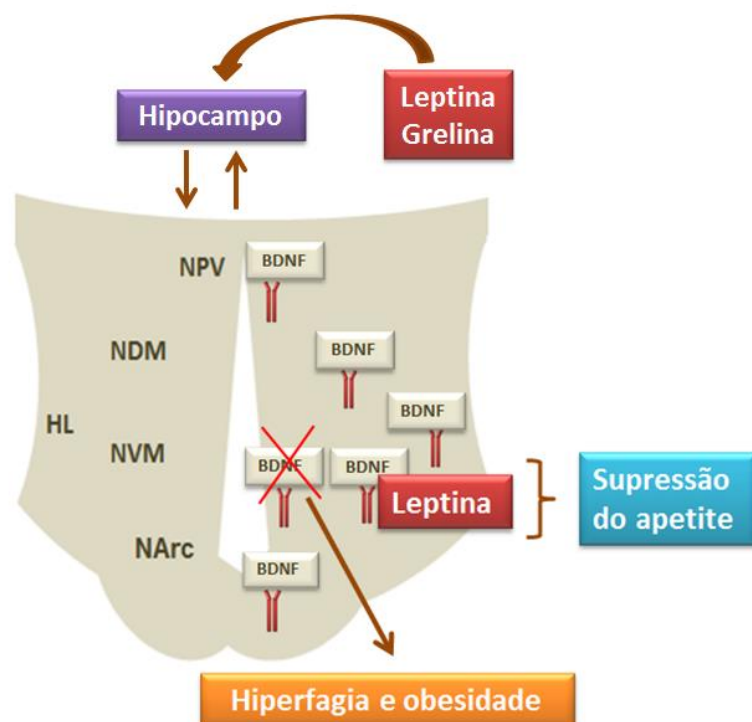


Figura 6. BDNF e o controle central do apetite. A figura mostra o hipotálamo com metade esquerda da figura mostrando a distribuição dos núcleos hipotalâmicos. BDNF: do inglês *brain derived*

neurotrophic factor; NPV: núcleo paraventricular; HDM: hipotálamo dorso medial; HL: hipotálamo lateral; NVM: núcleo ventromedial; NArc: núcleo arqueado. (Figura elaborada pela autora).

Considerando que os neurônios do hipocampo enviam informações para as áreas relacionadas ao controle da alimentação no SNC (Cenquizca and Swanson 2006), danos ao hipocampo reduzindo a plasticidade e funções hipocampais podem alterar a regulação do peso corporal e a homeostase energética, levando à obesidade (Benoit, Davis et al. 2010). Neurônios hipocampais comunicam-se com várias regiões encefálicas envolvidas na ingestão de alimentos, incluindo o núcleo arqueado do hipotálamo, o núcleo do trato solitário, a ínsula e o córtex pré-frontal (Cenquizca and Swanson 2007; Lenard and Berthoud 2008; Rolls 2008). Além disto, o hipocampo também possui receptores que são ativados por hormônios relacionados ao controle alimentar, como a grelina e a leptina (Lathe 2001) reforçando seu papel no controle alimentar. A expressão de BDNF pode estar alterada no estresse crônico e na obesidade, e em ambas as situações esta alteração pode desencadear alterações no humor e/ou no comportamento alimentar.

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Esta tese tem como foco principal a obesidade e o estresse crônico, dois importantes fatores desencadeantes de alterações na homeostase que contribuem para o surgimento de graves comorbidades metabólicas e comportamentais. A inegável relação entre o crescente aumento das taxas de obesidade com as drásticas alterações ocorridas no padrão alimentar nas últimas décadas motivou a escolha da dieta de cafeteria, que simula um padrão ocidental de alimentação, como modelo experimental de obesidade empregado neste estudo. Dietas altamente palatáveis induzem aumento no consumo alimentar, desencadeando hiperfagia e alterações na homeostase energética. O controle da ingestão alimentar é orquestrado por um vasto número de hormônios e peptídios periféricos e centrais que, em situação de homeostase, garantem um comportamento alimentar padrão com base no gasto energético. Ao contrário, na perda da homeostase energética, como acontece na obesidade, ocorre alteração na correta sinalização do controle do apetite modificando o comportamento alimentar. Da mesma forma, o modelo de estresse empregado nesta tese simula o estresse cotidiano enfrentado pela maioria das pessoas atualmente. O estresse crônico tem forte relação com importantes distúrbios do comportamento, em especial a depressão. O controle

alimentar também pode ser influenciado pelo estresse uma vez que os glicocorticoides liberados em situações de estresse podem alterar a sinalização do apetite. Partindo do pressuposto de que obesidade e estresse crônico são fatores envolvidos com importantes alterações neuroendócrinas e comportamentais ao aplicar isoladamente ou em associação estes fatores os protocolos experimentais empregados nesta tese visam avaliar seus efeitos na neuroplasticidade e no comportamento animal que possam contribuir para o entendimento das bases biológicas das comorbidades a eles associados.

3 HIPÓTESES DE TRABALHO

3.1 Hipótese 1

A exposição à dieta de cafeteria por um período de seis semanas desencadeia obesidade, levando a alterações metabólicas e comportamentais em ratos Wistar machos que podem ser aferidas através de marcador molecular e bioquímicos em tecido nervoso central, bem como mediante testes comportamentais.

3.2 Hipótese 2

A exposição à dieta de cafeteria associada a um modelo de estresse crônico por restrição por um período de doze semanas desencadeia obesidade, levando a alterações metabólicas e comportamentais em ratos Wistar machos aferidas através de marcador molecular em tecido nervoso central, bem como mediante testes comportamentais.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil metabólico e neuroquímico em um modelo de obesidade associada ou não à exposição a estresse crônico em ratos Wistar machos em dois diferentes períodos de tempo.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Objetivos específicos do primeiro protocolo experimental

Avaliar:

- o comportamento alimentar;
- a atividade locomotora (teste de campo aberto) e o comportamento do tipo ansioso (teste do labirinto em cruz elevado);
- a viabilidade e o dano celular em fatias hipocampais;
- os níveis teciduais de BDNF em homogenato de hipocampo;

4.2.2 Objetivos específicos do segundo protocolo experimental

Avaliar:

- o delta de peso e o consumo calórico;
- o padrão comportamental de anedonia pelo teste de consumo de sacarose;
- o peso relativo das glândulas adrenais;
- os níveis teciduais de BDNF em homogenato de hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Primeiro protocolo experimental

No primeiro desenho experimental (Figura 6), 30 ratos Wistar machos com 60 dias de idade (peso 200-250 g) foram randomizados por peso e alojados em grupos de 5 animais por caixa-moradia de polipropileno (49x34x16cm). O tratamento foi iniciado uma semana após a randomização para permitir que os animais se aclimassem ao ambiente e ao convívio com os demais animais da caixa. Os 30 animais foram divididos em 2 grupos de 15, conforme segue: grupo controle (CT), que recebeu somente ração padrão de biotério, e grupo obesidade, que recebeu dieta de cafeteria e ração padrão de biotério. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro padrão de luz de 12 horas (luzes acesas às 07h00min e desligadas às 19h00min), em um ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com acesso à água e ração *ad libitum* (dieta de cafeteria e/ou dieta padrão). Aos animais que receberam dieta de cafeteria também foi ofertada ração padrão.

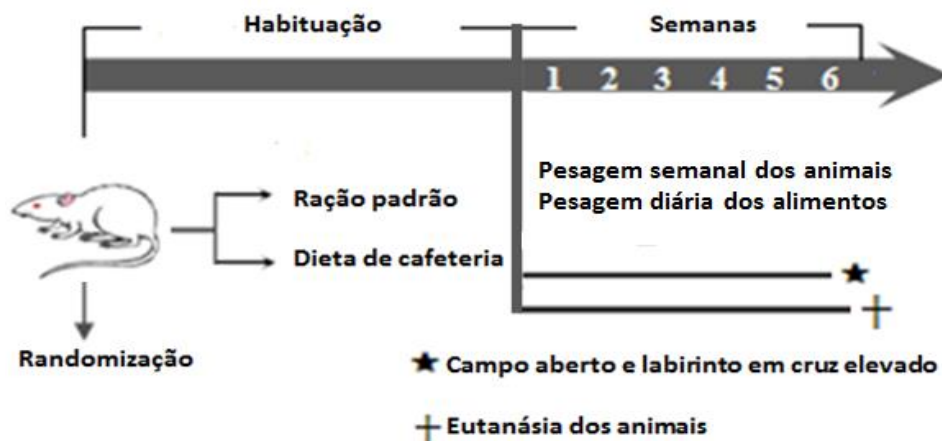


Figura 7. Primeiro desenho experimental.

5.2 Segundo protocolo experimental

No segundo desenho experimental (Figura 7), 32 ratos Wistar machos com 60 dias de idade (peso 200-250 g) foram randomizados por peso e alojados em grupos de 4 animais por caixa-moradia de polipropileno (49x34x16cm). O tratamento foi iniciado uma semana após a randomização para permitir que os animais se aclimassem ao ambiente e ao convívio com os demais animais da caixa.

Os 32 animais foram divididos em 4 grupos de 8, conforme segue: grupo controle, que recebeu somente ração padrão de biotério; grupo estresse, que recebeu ração padrão de biotério e foi exposto ao protocolo de estresse crônico; grupo dieta hipercalórica, que recebeu dieta de cafeteria; e grupo dieta hipercalórica + estresse, que recebeu dieta de cafeteria e foi exposto ao protocolo de estresse crônico. Todos os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro padrão de luz de 12 horas (luzes acesas às 07h00min e desligadas às 19h00min), em um ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com acesso à água e ração *ad libitum* (dieta de cafeteria e/ou dieta padrão). Aos animais que receberam dieta de cafeteria também foi ofertada ração padrão.

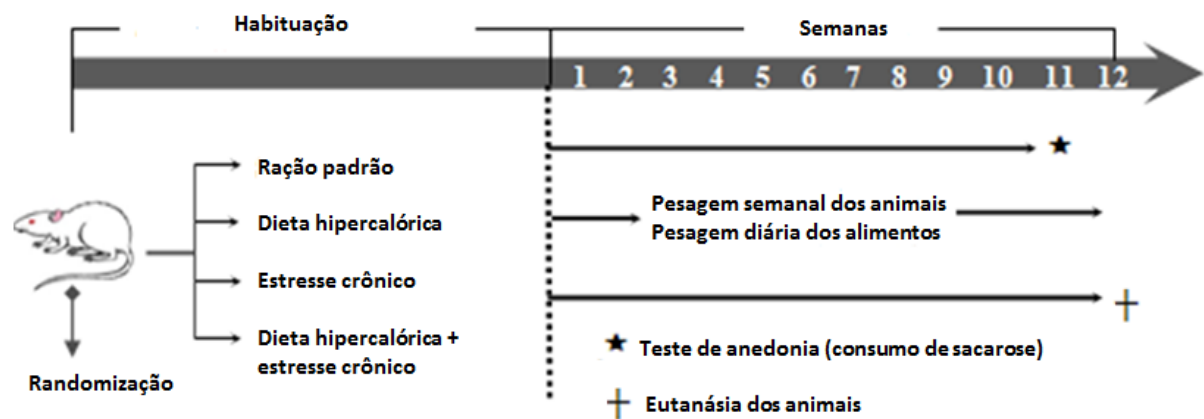


Figura 8. Segundo desenho experimental.

5.3 Tamanho de amostra

O número de animais empregados para realização dos protocolos experimentais que constituem esta tese foi escolhido considerando estudos da literatura que utilizam dieta e realizam testes neuroquímicos e comportamentais e que avaliam entre 8 e 16 animais por grupo. Esta proporção de animais é necessária para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio padrão (magnitude de efeito grande), considerando $\alpha = 0,05$ e poder de confiança de 90% (Torres, Buffon et al. 2002; Sweazea, Lekic et al. 2010; Macedo, Medeiros et al. 2012; de Oliveira, Scarabelot et al. 2014).

5.4 Modelo de obesidade

A dieta hipercalórica empregada é conhecida como dieta de cafeteria, (Estadella, Oyama et al. 2004; Sampey, Vanhose et al. 2011; Macedo, Medeiros et al. 2012) e é composta por alimentos de consumo humano como salgadinho, bolacha recheada, salsicha, *wafer*, leite condensado e refrigerante. A dieta de cafeteria consistiu de cerca de 60% de carboidratos, 20% de lipídios, 15% de proteínas, e 5% de outros constituintes (sódio, cálcio, vitaminas, sais minerais, conservantes e edulcorantes), totalizando 4,18 kcal/g (incluindo as calorias do refrigerante 0,42 kcal/ mL). A dieta padrão (Nuvilab CR-1, NUVITAL®, Curitiba, PR, Brasil) oferecida aos animais consistiu de 55% de carboidratos, 22% de proteína, 4,5% de lipídios e 18,5% de outros constituintes (sódio, cálcio, vitaminas, conservantes, sais minerais e fibras), totalizando 2,93 kcal/g. O valor calórico por g ou mL de cada dieta foi calculado com base nas informações fornecidas pelo fabricante no rótulo da embalagem. A ração padrão e/ou a dieta experimental eram substituídas diariamente. Todos os animais tiveram acesso à ração padrão para minimizar o risco de carências nutricionais. Os animais eram pesados semanalmente, e a ingestão de alimentos era registrada diariamente. O experimento foi realizado durante 6 semanas para o primeiro protocolo, e durante 12 semanas para o segundo protocolo.

5.5 Modelo de estresse crônico por restrição

Os animais foram submetidos ao modelo de estresse crônico por restrição aplicado no turno da manhã (entre 9h00min e 12h00min) (Torres *et al*, 2003), por um período de 1 hora diária, por 5 dias na semana, durante 6 ou 12 semanas. Para a contenção dos animais foi utilizado um tubo plástico (25 x 7 cm) ajustado ao corpo com fita adesiva evitando desconforto e compressão física, impedindo os movimentos do animal; a parte frontal apresentava uma abertura permitindo a respiração do animal e evitando hipertermia e sudorese excessiva (Ely, Dapper et al. 1997). Os animais eram devolvidos às suas caixas-moradia imediatamente após a exposição ao estresse. Os animais dos grupos controle foram mantidos em suas gaiolas durante todo o período experimental.

5.6 Delta de peso e consumo calórico (kcal)

Os animais eram pesados semanalmente pelo mesmo experimentador para evitar viés de experimentação. Ao final do experimento, foi calculado um delta para o peso corporal total (delta de

peso = peso final – peso inicial em gramas). As sobras dos alimentos eram pesadas diariamente, usando-se uma balança digital, para avaliar a quantidade de alimento consumido. O peso em gramas era convertido em kcal considerando que a dieta padrão contém 2,93 kcal/g, e a dieta de cafeteria, 4,18 kcal/g, conforme informações fornecidas pelo fabricante no rótulo da embalagem. Para estimar um consumo individual aproximado, levando em consideração que os animais aumentaram de peso de acordo com o volume consumido, o consumo semanal era corrigido para o peso corporal de cada animal (consumo individual = peso de cada animal X consumo semanal total da caixa/ soma do peso dos animais da caixa). No primeiro protocolo experimental, durante a sexta semana de tratamento houve uma redução no tempo de avaliação do consumo calórico devido a avaliação do comportamento hiperfágico, perfazendo 36h a menos de consumo.

5.7 Teste de campo aberto

A arena do campo aberto destina-se a quantificar a atividade locomotora espontânea geral. A avaliação comportamental foi realizada em uma arena envernizada, medindo 60 cm x 40 cm x 50 cm e com o interior revestido com vidro. O chão da arena é dividido em 12 quadrados de 13 cm x 13 cm cada. Os ratos eram gentilmente colocados no canto esquerdo posterior e eram monitorados para observar o perfil exploratório durante cinco minutos. O número de deslocamentos (quando o animal coloca as quatro patas em qualquer um dos quadrados) é associado à atividade locomotora; a latência para abandonar o primeiro quadrante é uma medida de ansiedade. Foram avaliados também o número de *rearings* (número de vezes em que o animal levanta-se sobre as patas traseiras, ficando perpendicular ao solo), o tempo de *grooming* (tempo dispendido em limpar-se, lamber-se) e o número de bolos fecais ao final dos cinco minutos de observação. A arena era limpa entre cada troca de animal (Ploeger, Spruijt et al. 1992; Silveira, Portella et al. 2005).

5.8 Teste do labirinto em cruz elevado

O teste de labirinto em cruz elevado representa importante instrumento de pesquisa na área experimental para estudos de comportamentos relacionados à ansiedade. O aparato consiste em um labirinto em cruz de PVC preto, elevado a uma altura de 50 cm acima do nível do chão. Apresenta dois braços abertos e dois braços fechados (50 cm x 40 cm x 10 cm), que se estendem a partir de uma plataforma central comum (10 cm x 10 cm). O animal era colocado na zona central do labirinto,

frontalmente para um dos braços abertos. Em seguida eram registradas as seguintes medidas comportamentais durante uma sessão de teste com duração de cinco minutos: número de vezes em que o animal coloca a cabeça para baixo mantendo o corpo protegido no braço fechado (PHD, do inglês *protect hand dipping*); número de vezes em que o animal coloca a cabeça para baixo com todo o corpo no braço aberto (NPHD, do inglês *non protect hand dipping*); número de entradas nos braços abertos (EOA, do inglês *enter open arms*); número de entradas nos braços fechados (ECA, do inglês *enter closed arms*); tempo em que o animal permanece com as 4 patas no nos braços abertos (TOA, do inglês *time open arms*); tempo em que o animal permanece com as 4 patas no nos braços fechados (TCA, do inglês *timer closed arms*); número de *rearings* (número de vezes em que o animal levanta-se sobre as patas traseiras, ficando perpendicular ao solo); tempo de *grooming* (tempo gasto em limpar-se, lamber-se); e o número de bolos fecais ao final dos cinco minutos (Lister 1987).

5.9 Avaliação do consumo de ração padrão e água após 24h de jejum

Para avaliar o estabelecimento de hiperfagia, todos os animais foram submetidos a jejum por 24 h antes do teste comportamental e em seguida, foi ofertado ração padrão e água *ad libitum* a ambos os grupos experimentais. O consumo foi avaliado individualmente, os animais foram colocados em caixas transparentes de *plexiglass* colocadas lado a lado permitindo que os animais percebessem a presença dos demais animais de seu grupo. Foi realizada habituação prévia repetida precedendo 48h e 24h antes do teste, quando os animais permaneceram por um período de 1h na caixa na presença de ração padrão. O consumo de ração padrão e água foi avaliado por um período de 12h consecutivas. O consumo de ração padrão durante a avaliação do comportamento hiperfágico não foi somado ao consumo calórico da última semana.

5.10 Morte dos animais e coleta das amostras

Vinte e quatro horas após o teste de hiperfagia, os animais foram mortos por decapitação sem uso de anestésico uma vez que barbitúricos ou anestésicos produzem depressão dose dependente do SNC e interferem nas avaliações neuroquímicas destes tecidos (Bickler and Fahlman 2006; Lu, Yon et al. 2006). Este método foi utilizado também por facilitar a coleta de grande volume de sangue para as análises sorológicas. O sangue troncular foi coletado em tubos plásticos e centrifugado por 5 minutos em 5000 X g em temperatura ambiente, e acondicionado em *ependorfs*

em alíquotas de 250µL. O material biológico (soro e tecidos) foi congelado a -80°C para posteriores análises.

5.11 Avaliação dos níveis de BDNF por ELISA

Os tecidos do SNC (córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo) foram pesados e homogeneizados utilizando-se um homogeneizador manual, em solução tampão. Os homogenatos resultantes foram centrifugados durante 10 min a 4500 rpm. Os níveis de BDNF foram determinados por (ELISA) usando-se um *kit* de reagentes para dosagens (Millipore, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. No primeiro protocolo experimental os níveis de BDNF hipocampal foram medidos e expressos como pg/mL de homogenato de tecido, enquanto no segundo protocolo experimental foram medidos como pg/µg de proteína e expressos por percentagem do controle. A quantidade total de proteínas foi medida pelo método de *Coomassie blue* usando albumina sérica bovina como padrão (Bradford, 1976).

5.12 Avaliação do dano e viabilidade celular (LDH e MTT) em hipocampo

Imediatamente após a eutanásia, os hipocampos eram rapidamente dissecados e fatiados em cortes transversais (400µm) em um cortador de tecidos Mcllwain. As fatias hipocampais de cada animal foram divididas em dois grupos: grupo controle (sem exposição *in vitro* ao H₂O₂) e grupo H₂O₂ (com exposição *in vitro* ao H₂O₂). Após, foram colocadas em poços de placa de cultura e pré-incubados durante 30 min em um meio contendo NaCl (120 mM), KCl (2 mM), CaCl₂ (1 mM), MgSO₄ (1 mM), HEPES (25 mM), KH₂PO₄ (1 mM) e glicose (10 mM), e a solução final ajustada para pH 7,4. Após a pré-incubação, o meio de cultura na placa contendo o grupo controle foi substituído, e as culturas foram incubadas durante mais 60 minutos a 37 ° C. Na placa contendo as amostras do grupo H₂O₂, foi adicionado 1 mM de H₂O₂ ao meio de cultura com incubação por 60 min a 37°C. Todas as incubações foram feitas simultaneamente, usando-se quatro fatias de hipocampo do mesmo animal em cada placa (Siqueira, Elsner et al. 2011). A viabilidade celular (atividade mitocondrial) e o dano celular (lise da membrana) foram avaliados no final do período de recuperação. O dano celular foi determinado através da liberação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura (Koh and Choi 1987). Após o período de recuperação, a atividade LDH foi quantificada, usando-se um *kit* disponível comercialmente (Doles Reagentes, Goiania, Brasil). Os valores de LDH foram normalizados a partir

da liberação de LDH do controle (Almli, Hamrick et al. 2001). As amostras foram quantificadas, utilizando uma curva padrão, e a densidade óptica foi medida a 490 nm. A atividade mitocondrial foi avaliada por ensaio colorimétrico MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Sigma Chemicals). Fatias de hipocampo foram incubadas com MTT (5 mg / ml) durante 30 min a 37 ° C. A desidrogenase mitocondrial em células vivas leva à clivagem e redução de MTT amarelo solúvel para formazan púrpura insolúvel, o qual foi extraído em dimetil-sulfóxido (DMSO). A densidade óptica foi medida a 560 e 630 nm (Mosmann 1983). Para ambos, LDH e MTT, os resultados foram expressos como percentagem de controle.

5.13 Análise estatística

Em ambos os protocolos experimentais, a análise estatística foi realizada usando-se SPSS versão 18 (SPSS Inc., Chicago, IL). A normalidade dos dados foi testada por *Kolmogorov-Smirnov*, e os dados paramétricos foram analisados pelo teste t de *Student* para amostras independentes, com os resultados expressos como média \pm erro padrão da média (SEM), enquanto os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de *Mann-Whitney*, com os resultados expressos como mediana com valor de mínimo e de máximo. Dados ao longo do tempo foram analisados por ANOVA de medidas repetidas (tempo x dieta) ou (tempo x dieta x estresse) e dados que apresentaram mais de um fator (dieta x estresse; dieta x LDH; dieta x H₂O₂) foram analisados pela ANOVA de duas vias, ambos os testes de ANOVA foram seguidos pelo teste de comparação múltipla de *Bonferroni* para análise par a par e os resultados expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.14 Considerações éticas

Todos os experimentos e procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA protocolo nº 09.231). O projeto apresentou-se em conformidade com a Lei Arouca, nº 11.794/2008, com a Resolução Normativa nº 12/2013 (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Resolução Normativa nº 13/2013 (Prática de Eutanásia-

CONCEA). Com base na legislação, todos os procedimentos visaram minimizar o sofrimento dos animais e diminuir fontes externas de dor e desconforto.

6 RESULTADOS DO PRIMEIRO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

6.1 Avaliação do consumo calórico (kcal) ao longo do tempo e do comportamento hiperfágico após jejum de 24h

A ANOVA de medidas repetidas mostrou que a ingestão alimentar sofreu efeito do tempo ($F_{(5,28)} = 25,599$, $p < 0,001$) com um aumento do consumo calórico ao longo do tempo em ambos os grupos. Houve interação entre tempo e dieta de cafeteria, resultado que mostra que a dieta de cafeteria influenciou no aumento do consumo calórico dos animais ($F_{(6,28)} = 9,449$, $p < 0,0001$), (Figura 8). O teste t de *Student* também mostrou significativa diferença entre os grupos na ingestão de ração ($t_4 = -11,371$, $p = 0,004$) e água ($t_4 = -5,879$, $p = 0,009$) após 24 horas de jejum, sugerindo que os animais previamente alimentados com dieta de cafeteria demonstram um aumento no consumo de ração padrão, sugerindo o desenvolvimento de um comportamento hiperfágico nestes animais (Figura 9).

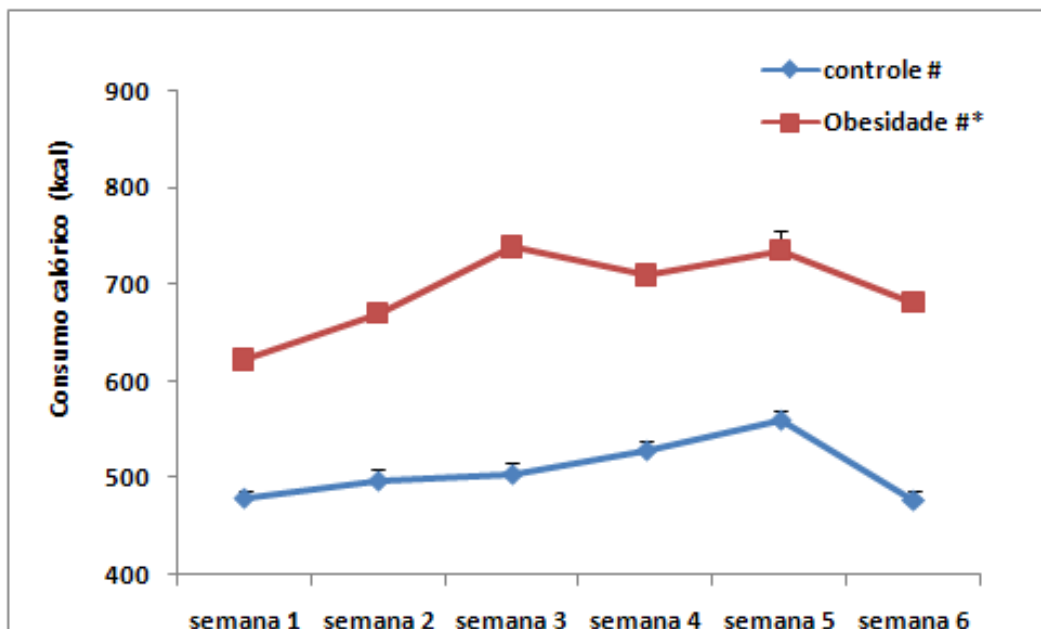


Figura 9. Consumo calórico (kcal) semanal por rato ao longo das 6 semanas de tratamento. Dados expressos como média \pm SEM. Grupo controle (ração padrão) e grupo obesidade (dieta de cafeteria). (*) Efeito significativo de dieta; (#) efeito significativo do tempo (ANOVA de medidas

repetidas/Bonferroni, $p < 0,0001$ para ambos, $n = 15$ animais/grupo). A queda no consumo na última semana resulta do teste de avaliação do comportamento hiperfágico.

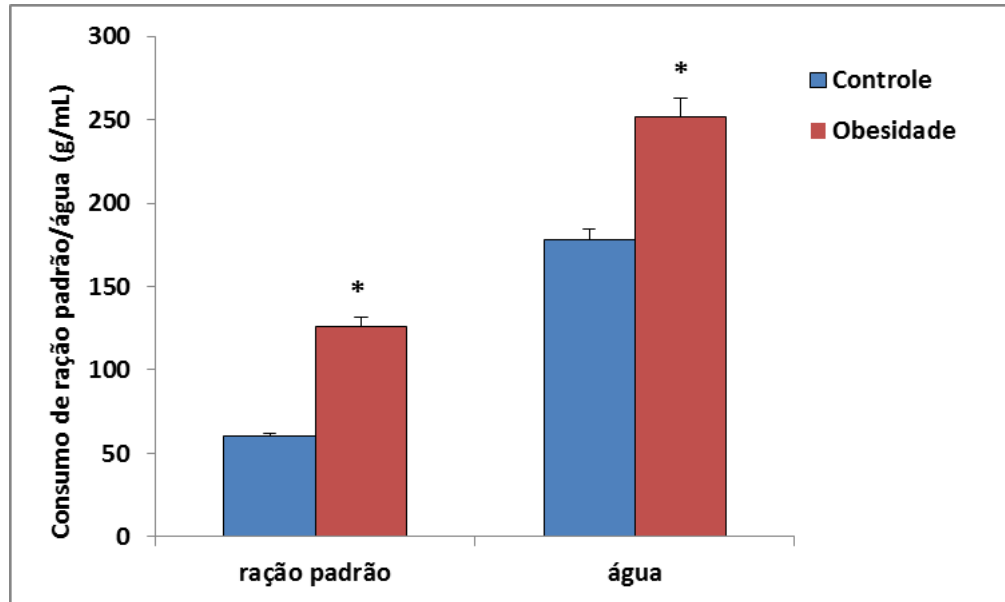


Figura 10. Avaliação do consumo de ração padrão e água por caixa após 24h de jejum. Dados expressos como média \pm SEM. Grupo controle (ração padrão) e grupo obesidade (dieta de cafeteria). (*) Diferença significativa entre os grupos para o consumo de ração e água (Teste t de Students, $p = 0,004$ e $p = 0,009$ respectivamente, $n = 15$ animais/grupo).

6.2 Delta de Peso (g)

A diferença entre o peso final e o inicial dos animais em estudos avaliados pelo teste t de Student confirma a eficácia da dieta de cafeteria na indução da obesidade. De acordo com o delta de peso os animais que consumiram dieta de cafeteria ganharam mais peso do que aqueles expostos à dieta padrão tornando-se obesos ($t_{28} = -2,948$, $p < 0,001$, $n = 15$ animais/grupo) (Figura 11).

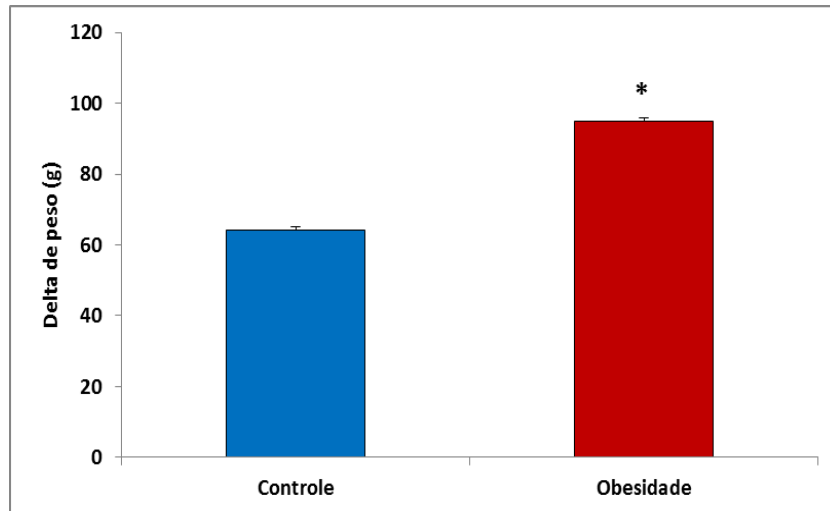


Figura 11. Diferença entre o peso final e o peso inicial dos animais em estudo (delta de peso). Dados expressos como média \pm SEM. Grupo controle (ração padrão) e grupo obesidade (dieta de cafeteria). (*) Diferença significativa entre os grupos. (Teste t de *Students*, $p < 0,001$, $n = 15$ animais/grupo).

6.3 Teste de campo aberto e do labirinto em cruz elevado

Os dados avaliados nos testes de campo aberto e do labirinto em cruz elevado não apresentaram uma distribuição normal, desta forma foi empregado um teste não paramétrico (*Mann Whitney*) para analisar o efeito da obesidade. O teste de campo aberto mostrou um aumento no número de *rearings* ($p = 0,02$) e no número de cruzamentos externos ($p = 0,03$) que acabou influenciando o aumento no número de cruzamentos totais ($p = 0,04$), mas sem alterações nos demais parâmetros analisados: latência, cruzamentos internos, *grooming* e bolos fecais ($p > 0,05$ para estes parâmetros) (Tabela 1). No teste do labirinto em cruz elevado, também houve um aumento no número de *rearings* ($p < 0,0001$), mas sem alterações nos demais parâmetros analisados: PHD, NPHD, EOA, ECA, TOA, *grooming* e bolos fecais ($P > 0,05$ para estes parâmetros) (Tabela 2). O aumento no número de *rearings* em ambos os testes e no número de cruzamentos externos no teste de campo aberto, sugere um aumento na atividade locomotora e exploratória dos animais expostos a dieta de cafeteria.

Tabela 1. Comportamentos avaliados no teste de campo aberto.

Comportamento	Controle	Obesidade
	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)
Latência (s)	4 (1-9)	6 (1-15)
Cruzamentos externos (n)	62 (30-74)	66 (47-98)*
Cruzamentos internos (n)	3 (0-9)	3.0 (0-8)
Cruzamentos totais (n)	65 (35-101)	104(54-150)*
Rearing (n)	16 (3-33)	21 (12-34)*
Grooming (s)	44 (0-90)	62 (0-133)
Bolos fecais (n)	3 (1-7)	4 (1-8)

Nota de rodapé: Teste de *Mann-Whitney* com mediana (valores de mínimo e máximo). Efeito da obesidade no número de *rearings* ($p=0,02$), nos cruzamentos externos ($p=0,03$) e cruzamentos totais ($p=0,04$); (n) número de eventos, (s) segundos.

Tabela 2. Comportamentos avaliados no labirinto em cruz elevado.

Comportamento	Controle	Obesidade
	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)
PHD (n)	1 (0-4)	1 (0-5)
NPHD (n)	3 (0-10)	2 (0-10)
EOA (n)	2 (0-5)	2 (05)
ECA (n)	3 (1-11)	4 (0-9)
TOA (s)	14 (6-52)	22 (0-52)
TCA (s)	259 (233-296)	244 (218-286)
Grooming (s)	32 (17-83)	35 (14-72)
Rearing (n)	9 (6-20)	29 (12-57)*
Bolos fecais (n)	2 (0-5)	2 (0-5)

Nota de rodapé: Teste de *Mann-Whitney* com mediana (valores de mínimo e máximo). Efeito da obesidade no número de *rearings* ($P<0.0001$); PHD, do inglês *protect hand dipping*, NPHD, do inglês *non protect hand dipping*, EOA, do inglês *enter open arms*, ECA, do inglês *enter closed arms*, TOA, do inglês *time open arms* e TCA, do inglês *timer closed arms*; (n) número de eventos e (s) segundos.

6.4 Avaliação dos níveis de BDNF, do dano (LDH) e viabilidade celular (MTT) em tecido hipocampal

O teste t de *Student* mostrou que a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria diminuiu significativamente os níveis de BDNF no hipocampo ($p = 0,04$) avaliados por ELISA (Figura 12). A liberação de LDH no meio de cultura foi empregada para avaliar o dano celular, e a ANOVA de duas vias mostrou um efeito do H_2O_2 ($F_{(1,6)} = 8,993$, $p = 0,006$) e da obesidade ($F_{(2,25)} = 0,005$, $p > 0,05$), aumentando o extravasamento de LDH das células do hipocampo (Figura 13), mas não foi observado interação entre estes dois fatores ($F_{(2,25)} = 0,005$, $p > 0,05$). A atividade mitocondrial foi avaliada para estimar a viabilidade celular e a ANOVA de duas vias mostrou um efeito do H_2O_2 ($F_{(1,6)} = 17,020$; $p = 0,001$) diminuindo a percentagem de células viáveis. Porém não foi observado efeito da obesidade neste parâmetro ($F_{(1,6)} = 2,110$, $p > 0,05$), nem interação entre os fatores ($F_{(2,25)} = 0,590$, $p = 0,05$) (Figura 14).

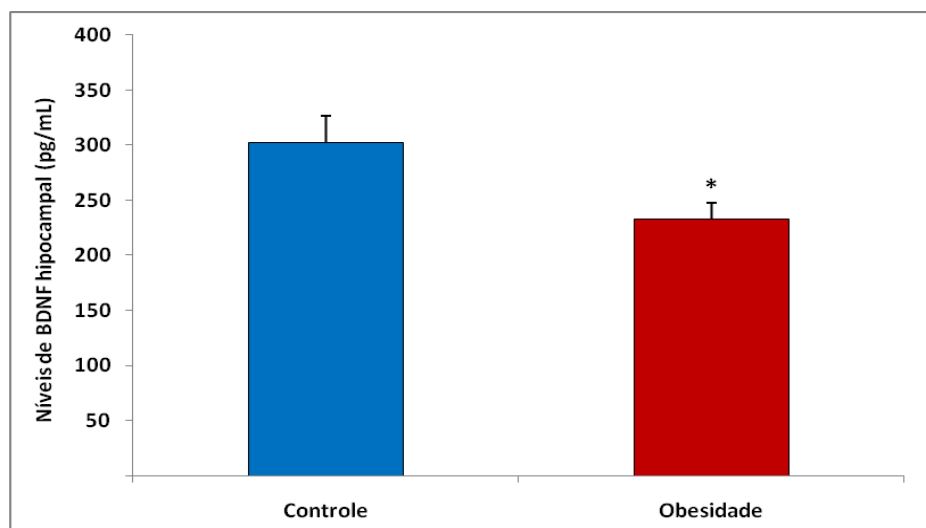


Figura 12. Níveis de BDNF em tecido hipocampal. Dados expressos como média \pm SEM. Grupo controle (ração padrão) e grupo obesidade (dieta de cafeteria). (*) Diferença significativa entre os grupos. (Teste t de *Students*, $p < 0,001$, $n = 8$ animais/grupo).

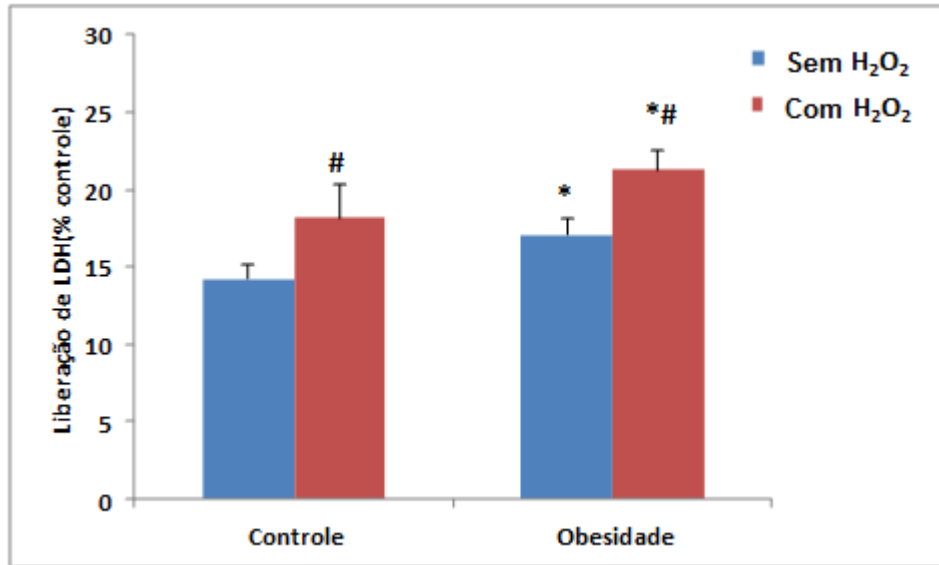


Figura 13. Avaliação de dano celular pela liberação de LDH em tecido hipocampal. Dados expressos como média \pm SEM. Grupo controle (ração padrão) e grupo obesidade (dieta de cafeteria). ([#]) Efeito do H₂O₂ na liberação de LDH (^{*}) Efeito da obesidade na liberação de LDH (ANOVA de duas vias/Bonferroni, $p = 0.006$ e $p = 0.03$ respectivamente, $n = 8$ animais/grupo).

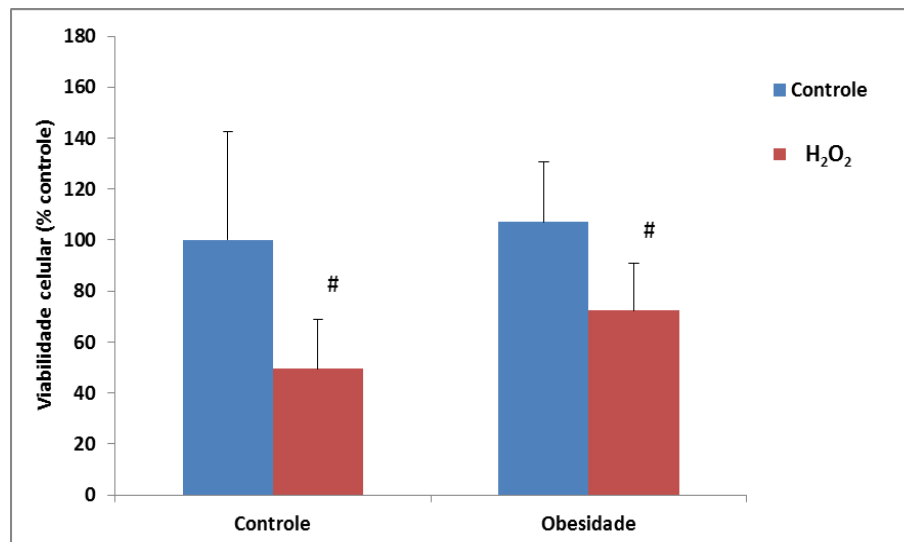


Figura 14. Avaliação da viabilidade celular pelo MTT em tecido hipocampal. Dados expressos como média \pm SEM. Grupo controle (ração padrão) e grupo obesidade (dieta de cafeteria). ([#]) Efeito do H₂O₂ (ANOVA de duas vias/Bonferroni, $p = 0.001$, $n = 8$ animais/grupo).

❖ ***A DISCUSSÃO PERTINENTE AOS RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS NO PRIMEIRO E NO SEGUNDO PROTOCOLO SERÁ APRESENTADA AO FINAL DESTA TESE, APÓS OS MANUSCRITOS.***

❖ ***OS RESULTADOS REFERENTES AO SEGUNDO PROTOCOLO EXPERIMENTAL SERÃO APRESENTADOS NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO.***

7 MANUSCRITO SUBMETIDO E ARTIGO PUBLICADO

7.1 Primeiro protocolo experimental

7.1.1 Manuscrito submetido ao *Neuroscience Journal (ELSEVIER)*

Manuscript Number: NSC-15-439

Title: OBESOGENIC DIET INDUCES HYPERPHAGIA ASSOCIATED WITH ALTERATIONS IN BDNF LEVELS AND SUSCEPTIBILITY TO HIPPOCAMPAL OXIDATIVE DAMAGE

Article Type: Research Paper

Section/Category: Cellular and Molecular Neuroscience

Keywords: BDNF; cell viability; hyperphagia; hippocampus; LDH release; obesity.

Corresponding Author: Dr. Iraci Lucena da Silva Torres, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Isabel C Macedo, Msc

Order of Authors: Isabel C Macedo, Msc; Ionara R Siqueira, PhD; Gisele A Iovatel, PhD; Karine Bertoldi, Msc; Viviane R Elsner, PhD; Joanna R Rozisky, PhD; Maria Flávia M Ribeiro, PhD; Iraci Lucena da Silva Torres, Ph.D.

Abstract: Increased consumption of hypercaloric diets has contributed significantly to the prevalence of obesity. Brain structures, especially the hypothalamus, are involved in food intake control; currently, the hippocampus has also been linked to energy intake. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which plays an important role in neural survival and plasticity, has been implicated in the regulation of energy homeostasis and food intake. In light of this, the aim of our study was to investigate the effects of hypercaloric diet-induced obesity on neurochemical and behavioral parameters. To investigate anxiety-like behaviors and locomotor activity, we used the Plus Maze and the Open Field tests, respectively. Delta weight values were used to evaluate the efficacy of the hypercaloric diet while caloric and food intake after fasting were measures of hyperphagia. The levels of BDNF and susceptibility to H₂O₂-induced oxidative damage (LDH release) were measured in hippocampal homogenates and slices, respectively. Exposure to the cafeteria diet for six weeks resulted in obesity, hyperphagia, and increased locomotor activity. Obese animals showed decreased BDNF levels and increased susceptibility to cellular damage in the hippocampus. The behavioral consequences of exposure to the cafeteria diet may be related to its biochemical effects on the brain; impairments in food intake regulation (hyperphagia) could be linked to the loss of hippocampal integrity.

OBESOGENIC DIET INDUCES HYPERPHAGIA ASSOCIATED WITH ALTERATIONS IN BDNF LEVELS AND SUSCEPTIBILITY TO HIPPOCAMPAL OXIDATIVE DAMAGE

Isabel Cristina de Macedo ^{1,2,3}, Ionara Rodrigues Siqueira ³, Gisele Augustin Lovatel ⁴, Karine Bertoldi ³, Viviane Rostirolla Elsner ⁶, Joanna Ripoll Rozisky ^{1,2,5}, Wolnei Caumo ⁵, Iraci Lucena da SilvaTorres ^{1,2,3*}

¹ Pain and Neuromodulation Laboratory, Department of Pharmacology, Federal University of Rio Grande do Sul, Institute of Basic Health Sciences, Porto Alegre, Brazil

² Molecular and Protein Analysis Unit, Clinical Hospital of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

³ Graduate Program in Biological Sciences – Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Institute of Basic Health Sciences, Porto Alegre, Brazil

⁴ Graduate Program of Physical Therapy, Federal University of Santa Catarina in Araranguá, Brazil

⁵ Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁶ Graduate Program in Bioscience and Rehabilitation of IPA Methodist University Center, Porto Alegre, Brazil

*CORRESPONDING AUTHOR:

E-mail: iracitorres@gmail.com (Iraci Lucena da Silva Torres)

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 3308 3183; FAX: +55 51 3308 3121

Abstract

Increased consumption of hypercaloric diets has contributed significantly to the prevalence of obesity. Brain structures, especially the hypothalamus, are involved in food intake control; currently, the hippocampus has also been linked to energy intake. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which plays an important role in neural survival and plasticity, has been implicated in the regulation of energy homeostasis and food intake. In light of this, the aim of our study was to investigate the effects of hypercaloric diet-induced obesity on neurochemical and behavioral parameters. To investigate anxiety-like behaviors and locomotor activity, we used the Plus Maze and the Open Field tests, respectively. Delta weight values were used to evaluate the efficacy of the hypercaloric diet while caloric and food intake after fasting were measures of hyperphagia. The levels of BDNF and susceptibility to H₂O₂-induced oxidative damage (LDH release) were measured in hippocampal homogenates and slices, respectively. Exposure to the cafeteria diet for six weeks resulted in obesity, hyperphagia, and increased locomotor activity. Obese animals showed decreased BDNF levels and increased susceptibility to cellular damage in the hippocampus. The behavioral consequences of exposure to the cafeteria diet may be related to its biochemical effects on the brain; impairments in food intake regulation (hyperphagia) could be linked to the loss of hippocampal integrity.

Keywords: cell viability; BDNF; hippocampus; obesity; LDH release.

Introduction

Obesity is a major risk factor for the onset of metabolic disorders. It is caused by increased food intake and/or hypercaloric diets and can induce cognitive alterations, which in turn contribute to the pathogenesis of neurodegenerative diseases (Luchsinger, Tang et al. 2002; Solfrizzi, D'Introno et al. 2005; Unger, Calderon et al. 2007). Obesity is also associated with impairments in hippocampal synaptic plasticity (Greenwood and Winocur 1990; Molteni, Barnard et al. 2002), reduced brain volume (Pannacciulli, Del Parigi et al. 2006), and contributes to increased oxidative stress, which can lead to cell damage (Furukawa, Fujita et al. 2004; Sinha, Ghosh et al. 2014). In turn, changes in hippocampal function can result in obesity (for a review, see Parent, Darling et al. 2014). Several studies using obesity model diets have shown associations between those diets and impairments in hippocampal functions such as cognition (Molteni, Barnard et al. 2002; Jurdak and Kanarek 2009). In addition, obesogenic diets triggering hippocampal changes have been associated with neurodegenerative diseases (Maesako, Uemura et al. 2012; Cohen and Klunk 2014; Koga, Kojima et al. 2014).

The role of BDNF is to regulate the survival and differentiation of neuronal populations in the developing central nervous system (CNS). In the adult nervous system, BDNF contributes to hippocampal plasticity; its expression is modulated by a variety of neurotransmitter and neuromodulatory systems implicated in hippocampal-dependent memory and learning (Tyler, Alonso et al. 2002; Lu, Christian et al. 2008). More recently, BDNF has also been reported to have an important role in energy metabolism regulation and feeding behavior (Noble, Billington et al. 2011). Additionally, a previous study has shown that decreased levels of BDNF can lead to obesity and hyperphagia (Yu, Wang et al. 2009).

It is well established that, in the hypothalamus, BDNF is an important satiety factor that modulates the control of food intake (Pandit, de Jong et al. 2011; Rios 2013). A number of studies have suggested that the typical Western diet, rich in saturated fat and refined sugars, can trigger obesity (Sampey, Vanhose et al. 2011; Macedo, Medeiros et al. 2012) and impair hippocampal function (Francis and Stevenson 2011). Of note, the ventral hippocampus neurons send information to areas related to eating such as the hypothalamus (Cenquizca and Swanson 2007). Thus, the hippocampus, which is primarily associated with memory, has also an influence on food and memory intake and on satiety (for a review, see (Parent, Darling et al. 2014). Considering that obesity can lead to changes in hippocampal function and impairment of food-related behavior, the aim of the present

study was to investigate the effects of Western diet-induced obesity related to anxiety-like behaviors in the elevated plus maze test (EPM) and to locomotor activity in the open field test (OF). Additionally, we sought to assess hippocampus BDNF levels, a critical component of synaptic plasticity. In order to further investigate the effect of obesity on hippocampal cell viability, we also evaluated its susceptibility to oxidative injury and measured the release of lactate dehydrogenase (LDH)—a well-known marker of cell damage. Delta weight values were calculated to assess the efficacy of the hypercaloric diet in inducing obesity, while post-fasting caloric and food intake were used to determine the occurrence of hyperphagia.

Methods

Animals and Experimental design

Thirty 60-day-old male Wistar rats (weight, 200–250 g) were randomized by weight and housed in groups of five in polypropylene (49 x 34 x 16 cm) cages. All animals were kept on a standard 12-hour light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m. and lights off at 7:00 p.m.) in a temperature-controlled environment ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), with access to water and chow *ad libitum* (cafeteria diet and/or standard rat chow). All experiments and procedures were approved by the institutional Committee of Animal Care and Use (GPPG-HCPA, protocol No. 09231) and were compliant with Brazilian guidelines pertaining to the use of animals in research (Law No. 11794). Vigorous attempts were made to minimize animal suffering, decrease external sources of pain and discomfort, and use the minimum number of animals required for the production of reliable scientific data. The rats were acclimated to their cages for 1 week before the start of the experiment. The animals were divided into two groups: control and obesity. They were weighed on a weekly basis and daily food consumption was recorded throughout the 6 weeks of the experiment.

Obesity model

The standard diet (Nuvilab CR-1, NUVITAL[®], Curitiba, PR, Brazil) was composed of 55.0% carbohydrates, 22.0% protein, 4.5% lipids, and 18.5% other constituents (fiber and vitamins) while the palatable high-calorie diet (cafeteria diet) consisted of approximately 60.0% carbohydrates, 20.0% lipids, 15.0% protein, and 5.0% other constituents (sodium, calcium, vitamins, preservatives, minerals, among others). The palatable diet was adapted from the “cafeteria” or Western diet (Estadella,

Oyama et al. 2004; Macedo, Medeiros et al. 2012), which contains foods such as crackers, wafers, sausages, chips, condensed milk, and soda. Both the standard chow and the experimental diet were replaced daily. All animals had access to standard chow and water, including those in the cafeteria diet group. The efficacy of the model in inducing obesity was evaluated using the delta weight, or the difference in animal weight from baseline to experiment completion.

Calorie intake (kcal)

The food was weighed daily to assess the amount consumed per cage. The weight in grams was then converted to Kcal (standard rat diet: 2.93 kcal/g; cafeteria diet: 4.18 kcal/g). Using a digital scale, daily food consumption (in grams) was calculated for each cage (amount of food placed in the feeders minus the remaining food) and averaged for a week (total food consumption). To estimate consumption per animal, the total food consumption was multiplied by each animal's weight (in grams) and divided by the total sum of weights for all animals in its cage, whereby an approximate value of individual consumption was obtained. Consumption was assessed according to the type of diet offered: standard chow (2.93 kcal/g) or hypercaloric diet (4.18 kcal/g). The animals were weighed weekly, and the change in body weight was calculated by the difference between the final and baseline weights.

Standard food and water intake assessment after 24 hours of fasting

To assess the establishment of hyperphagia, all animals were fasted for 24 h before the behavioral testing and then were supplied standard chow and water ad libitum for both experimental groups. Consumption was individually assessed, the animals were placed in clear plexiglass boxes placed next to each animal allowing perceive the presence of the other animals of their group. Repeated prior habituation was accomplished preceding 48h and 24h before the test when the animals were maintained for a period of 1h in box in the presence of standard chow. Consumption of standard chow and water was evaluated for a period of 12 hours in a row. The standard feed intake during this evaluation was not added to the caloric intake of the last week.

Behavioral tests

Open field test (OF)

Behavior was evaluated in a 60 x 40 x 50 cm varnished wooden box with glass-lined walls. The floor was divided by dark lines into 12 squares of 13 x 13 cm each. The rats were gently placed in the left back corner of the box and allowed to explore the surroundings for 5 minutes (Bianchin, Walz et al. 1993; Carlini, Monzon et al. 2002). The number of line crossings by each animal was taken as a measure of locomotor activity (Roesler, Walz et al. 1999); the latency to leave the first quadrant was taken as a measure of anxiety (Lister 1990). Rearing was defined as the moment the rat rose up on its hind legs, ending when one or both front paws touched the floor again (Wells, Krikke et al. 2009); this behavior was evaluated as exploratory activity (Silveira, Portella et al. 2005). Grooming was defined as licking/washing of the head and body; it was assessed as a biological function of caring for the surface of the body (Spruijt, van Hooff et al. 1992). On the other hand, excessive grooming could indicate anxiety-like behavior (Nin, Couto-Pereira et al. 2012). The start of a trial was considered immediately after the rat was placed in the environment for scoring purposes. In the OF test, an animal was recorded as entering a new area when all four paws had crossed the boundary into a different, marked-out area. Five measures were taken during the 5-min test sessions: latency to leave the first quadrant (in seconds); number of line crossings (i.e., horizontal activity), outer and inner crossings; grooming (in seconds); number of rearing behaviors (i.e., vertical activity); and number of fecal boluses. The box was cleaned between trials.

Elevated plus-maze test (EPM)

The elevated plus-maze test was used to evaluate anxiety behaviors. The maze was made of black Polyvinyl chloride (PVC) and elevated to a height of 50 cm above floor level. The apparatus consisted of two open arms and two closed arms (50 x 40 x 10 cm) extending from a common central platform (10 x 10 cm). The animals were placed on the central platform of the maze, facing one of the open arms. The following behavioral measures were recorded during each 5-min session: number of protected head-dips (PHD); number of non-protected head-dips (NPHD); number of entries in the open arms (EOA); number of entries in the closed arms (ECA); time spent in the open arms (TOA); time spent in the closed arms (TCA); time spent grooming; number of rearings; and number of fecal droppings. Protected head-dipping refers to dipping the head over the sides of the maze from the central platform or a closed arm, whereas unprotected head dips occurred when the animal dipped its head over the sides of the maze while in an open arm. Entry into a new area was recorded when all

four paws crossed into a new arm or into the central area (Lynn and Brown 2009). After each test, the apparatus was cleaned to remove animal scents.

BDNF immunoassay

The hippocampi were weighed and homogenized in a buffer solution using a handheld homogenizer. The resulting homogenates were centrifuged for 10 min at 4500 rpm. BDNF levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the ChemoKine kit (Millipore) according to manufacturer recommendations. Levels of BDNF were expressed as pg/mL of homogenate.

Preparation of hippocampal slices and susceptibility to H₂O₂-induced cell damage

The rats were killed by decapitation after 40 days of treatment. The hippocampi were quickly dissected and cross-sections (400 µm) were made using a McIlwain tissue chopper. The hippocampal slices of each animal were grouped into two sets (control condition and in vitro exposure to H₂O₂), placed into separate 24-well culture plates, and pre-incubated for 30 min in a medium with the following composition: 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 25 mM HEPES, 1 mM KH₂PO₄, and 10 mM glucose, adjusted to pH 7.4. After pre-incubation, the medium in the control plate was replaced, and cultures were incubated for another 60 min at 37°C. In the H₂O₂-induced injury plate, 1 mM H₂O₂ was added to the medium when it was renewed, and cultures were subsequently incubated for 60 min at 37°C. The control and H₂O₂ experiments were run simultaneously, using four hippocampal slices from the same animal in each plate (Siqueira, Elsner et al. 2011). Cell viability (mitochondrial activity) and damage (membrane lyses) were evaluated at the end of the recovery period.

Cell damage and viability

Cell damage was determined by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) into the culture medium (Koh and Choi 1987). After the recovery period, LDH activity was quantified using a commercially available kit (Doles Reagents, Goiania, GO, Brazil). Background LDH release into control wells was subtracted from other values to normalize each experiment (Almli, Hamrick et al. 2001). Samples were quantified using a standard curve; optical density was measured at 490 nm.

Results were expressed as percentages of control values. Mitochondrial activity was evaluated by the colorimetric MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma Chemicals). Hippocampal slices were incubated with MTT (5 mg/mL) for 30 min at 37°C. Active mitochondrial dehydrogenase in living cells leads to the cleavage and reduction of soluble yellow MTT to insoluble purple formazan, which was then extracted in dimethyl sulfoxide (DMSO). Optical density was measured at 560 and 630 nm (Mosmann 1983). Results were expressed as percentages of the controls.

Statistical analysis

Data and interactions were evaluated by Student's *t*-test and results were expressed as the mean \pm standard error of the mean, paired *t*-tests, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests, or repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post-tests (effects of time or diet), as appropriate. Between-group differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Calorie intake (kcal) and food/water intake after 24 h of fasting (g and mL)

The two-way repeated-measures ANOVA showed that food intake was affected by time ($F_{(5,28)} = 25.599$, $p < 0.001$) and by the interaction between time and diet ($F_{(6,28)} = 9.4491$, $P < 0.0001$) (Figure 1, panel A). Student's *t*-test also demonstrated significant between-group differences in food ($p = 0.004$) and water intake ($p = 0.009$) after 24 h of fasting, indicating hyperphagia by animals exposed to a hypercaloric diet (Figure 1, panel B).

Obesity parameters

Animal weights were used to confirm the efficacy of the cafeteria diet in inducing obesity. As evidenced by Student's *t*-test, delta weights differed significantly between groups ($p < 0.001$), showing that animals consuming a hypercaloric diet gained more weight than those exposed to the standard diet exclusively (Figure 1, panel C).

.....
Insert figure 1: panel A, B and C

.....

Behavioral tests

Open field test and elevated plus-maze test

Data from the OF and EPM tests were not normally distributed ($p > 0.05$). Because of that, the Mann-Whitney test was used to analyze the effect of obesity. In the OF test, obesity led to a higher number of rearing behaviors ($p = 0.02$) and outer crossings ($p = 0.03$), thus indicating an increase in exploratory behaviors (Table 1). In the EPM test, rearing frequency was increased for obesity ($p < 0.0001$), but not for PHD, NPHD, EOA, ECA, and TOA ($p > 0.05$ for these parameters) (Table 2).

.....

Insert table 1

.....

.....

Insert table 2

.....

BDNF immunoassay, cell damage and cell viability analysis

Obesity had a significant effect on hippocampal BDNF levels as demonstrated by a Student's t -test ($p = 0.04$) (Figure 3, panel A). A two-way ANOVA showed that H_2O_2 ($F_{(1,6)} = 8.993$, $p = 0.006$) and obesity ($F_{(1,6)} = 4.798$, $p = 0.03$) had significant effects on LDH leakage, which suggests that exposure to the cafeteria diet can affect LDH release. No interaction was observed between LDH release and obesity ($F_{(2,25)} = 0.005$, $p > 0.05$) (Figure 3, panel B). Mitochondrial activity was used to estimate the cell viability. A two-way ANOVA indicated that the cell viability was affected by H_2O_2 exposure ($F_{(1,6)} = 17.020$, $p = 0.001$) but not by obesity ($F_{(1,6)} = 2.110$, $p > 0.05$) or by interactions between those two factors ($F_{(2,25)} = 0.590$, $p = 0.05$). As expected, cell viability was lower in the presence of H_2O_2 (Figure 3, panel C).

.....
Figure 3: panel A, panel B and panel C
.....

Discussion

The present study showed that animals fed with cafeteria diet for 6 weeks developed obesity, as indexed by weight increases over time. In addition, the evaluation of food and water intake after a 24-h fast indicated that animals on the cafeteria diet became hyperphagic, showing a typical binge eating behavior. The caloric intake increase induced by the cafeteria diet led to a higher intake of standard chow by these animals after fasting. Obese animals also exhibited decreased BDNF levels and greater susceptibility to cell damage in the hippocampus. Further, we noted that vertical locomotor activity and exploration were also significantly greater in obese animals, as evidenced by their higher rearing frequency (EPM and OF tests) and increased number of outer crossings and total crossings (OF test).

The cafeteria diet is a successful, widely used obesity model (Sampey, Vanhoose et al. 2011; Macedo, Medeiros et al. 2012; South, Holmes et al. 2014). This diet model comprising a variety of palatable foods is a particularly strong stimulator of food consumption in rats (Treit, Spetch et al. 1983). Previous studies by our group have shown that exposure to the cafeteria diet for 6 weeks can trigger an elevation in serum triglycerides as well as hyperleptinemia (Bohm, Ordelheide et al. 2012; Macedo, Medeiros et al. 2012). Leptin regulates energy intake through anorexigenic signaling (Xu, Goulding et al. 2003); however, in obesity, this hormone loses the ability to control food intake, which suggests that the effects of leptin are subject to leptin resistance (Macedo, Medeiros et al. 2012). In addition, the increase in serum triglyceride levels is the major cause of leptin resistance because of impaired blood–brain barrier leptin transport (Banks, Clever et al. 2000).

The present study also showed a decrease in hippocampus BDNF levels, which can contribute to the establishment of hyperphagia. It is known that BDNF plays several roles in neurological development and synaptic plasticity through the trkB and p75 receptors. Currently, it has been associated with anorexigenic activity (Dunbar, Reddy et al. 2008; Noble, Billington et al. 2011; Autry and Monteggia 2012), food intake, and appetitive behaviors (Higgs 2005; Petrovich and Gallagher 2007). All the pathways stimulated by orexigenic and anorexigenic factors can also be

modulated by BDNF (Rothman, Griffioen et al. 2012; Rios 2013). Hippocampal neurons receive and relay neural signals regarding food stimuli from multiple important brain regions involved in food intake, including the arcuate nucleus of the hypothalamus, the nucleus of the solitary tract, the insula, and the prefrontal cortex (Cenquizca and Swanson 2007; Lenard and Berthoud 2008; Rolls 2008). Moreover, the hippocampus contains receptors activated by pre-and postprandial hormones and adiposity signals, such as bombesin, ghrelin, and leptin (Lathé 2001). Lesions in the ventromedial hypothalamic nucleus, for instance, where BDNF is highly expressed (Kernie, Liebl et al. 2000), produce a robust obesity syndrome and hyperphagia, similar to that observed in leptin-deficient mice (Yu, Wang et al. 2009). By contrast, intracerebroventricular BDNF administration reduces energy intake and body weight (Pellemounter, Cullen et al. 1995) and reverses hyperphagic and obese phenotypes in BDNF heterozygous mutant mice (Kernie, Liebl et al. 2000). In humans, genetic polymorphisms of BDNF (Beckers, Peeters et al. 2008; Burns, Schmidt et al. 2010) and mutations of the gene encoding its *TrkB* receptor (Yeo, Connie Hung et al. 2004) have been associated with impairments in food intake regulation and the development of obesity. These findings suggest that BDNF participates in normal body weight control and counteracts obesity and related diseases (Wang, Godar et al. 2010). It appears that the hyperphagia triggered by a reduction in BDNF levels is more the result of the loss of maintenance of mature neurons than developing ones (for a review, see (Rios, Fan et al. 2001). Interactions between BDNF and leptin can lead to appetite suppression as leptin induces local translation of BDNF mRNA in dendrites of hypothalamic neurons (Liao, An et al. 2012). In the present animal model, this mechanism may have been compromised, thus contributing to the establishment of overeating, since we noted a decrease in hippocampus BDNF levels. It is worth noting that a previous study from our group using the same obesity model over the same length of time triggered hyperleptinemia (Macedo, Medeiros et al. 2012).

Consistent with the hippocampal damage caused by obesity as indexed by decreased BDNF levels, the present study also showed hippocampal cell damage determined by measuring LDH levels in the culture medium in the absence and presence of H₂O₂. Interestingly, in the obese animals, the susceptibility to hippocampal cell damage was found to be increased even in the absence of H₂O₂ exposure, suggesting that obesity alone induces membrane cell damage and LDH leakage. The cell membranes of obese animals may already be compromised at baseline, thus being significantly more prone to cell death. In fact, obesity is frequently associated with increased oxidative stress

(Furukawa, Fujita et al. 2004), a condition linked to cell damage (Sinha, Ghosh et al. 2014). Oxidative damage to proteins and lipids have been reported in the tissues of obese and diabetic subjects (Fridlyand and Philipson 2006). Additionally, higher fat and carbohydrate intake may be partly responsible for increased oxidative stress due to saturation of electron transport chains. Free fatty acids, which are normally abundant in obesity, lead to high H_2O_2 levels in mitochondria. The link between obesity and enhanced oxidative stress may involve hyperglycemia, high levels of circulating fat, and decreased antioxidant defenses, thereby inducing a chronic inflammatory state (for review see (Ruperez, Gil et al. 2014)).

The present study showed no significant differences in the manifestations of anxiety-like behaviors between obese and control animals in the EPM, whereas locomotor and vertical exploratory activities were significantly greater in obese animals. This result was evidenced by higher frequencies of rearings and of outer and total crossings in the OFT, respectively. Such outcome may be related to an increase in leptin levels, since this hormone intensifies locomotor and exploratory activities as well as the sensitivity to highly palatable food (for a review, see (Murray, Tulloch et al. 2014)). By contrast, pan-leptin receptor knockout mice, which do not respond to leptin due to non-signaling receptors, show reduced locomotor activity (Wang, Kastin et al. 2013). These findings suggest that an hippocampal injury could also influence the increase in locomotor activity as a consequence of the increased palatable food search. Parents and co-workers (2014) hypothesize that hippocampal neurons produce a memory of the meal (episodic memory) that helps to determine the interval between meals. The hippocampus-dependent episodic memory damage can lead to loss of the ability to discriminate the state of satiety and increased food intake (for a review, see (Parent, Darling et al. 2014)). Considering the importance of integrity in hippocampal memory formation, the decrease in BDNF levels, and the increase in hippocampal cellular damage, we could suggest that obese animals have impaired episodic memory and satiety state recognition. In addition, the hyperphagia observed in the present study may derive from the higher number of meals with resulting increased caloric intake. Moreover, the increase in the number of meals and accompanying decrease in intervals between meals may result from the increase in locomotor activity. Therefore, these findings seem to support the idea that damage to the hippocampus alters feeding behavior.

In conclusion, exposure to the cafeteria diet can have several behavioral effects and result in hyperphagia with ensuing obesity. In turn, hyperphagia and obesity may be linked to loss of

hippocampal integrity as evidenced by increased LDH release and decreased BDNF levels. Importantly, the increase in locomotor and exploratory activities could be associated with the higher number of meals and amount of food ingested, and both may be related to binge eating (hyperphagia). The widespread expression of BDNF and its receptor on the CNS can provide pharmacological alternatives in obesity treatments. Therefore, it is vital to elucidate the complex mechanisms involving the modulation of BDNF on food control and its relationship with the orexigenic and anorexigenic pathways and eating patterns.

Competing interests

The authors report no conflicts of interest. The authors are responsible for the content and drafting of this paper.

Acknowledgements

This study was supported by the following Brazilian funding agencies: National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (ILS Torres; Caumo W); Committee for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES (IC de Macedo; JR Rozisky; GA Lovatel, K Bertoldi, VR Elsner, G Laste); Graduate Research Group of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* - GPPG –FIPECPA (ILS Torres – grant No. 110455).

Legends

Figure 1, Panel A: Calorie intake (Kcal). Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), n = 15 animals/group

Notes: C: control group (receiving standard chow); OB: obesity group (receiving hypercaloric diet)

(*) Significant effect of diet or ([#]) significant effect of time (repeated measures ANOVA with Bonferroni test, $p < 0.0001$ for both)

Figure 1, Panel B: Analysis of food and water intake after a 24-h fast (g or mL). Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), n = 15 animals/group

Notes: C: control group (receiving standard chow); OB: obesity group (receiving hypercaloric diet)

(*) Significant differences between groups in food intake and in water intake (Student's t -test, $p = 0.004$ and $p = 0.009$ respectively)

Figure 1, Panel C: Delta weight (g). Difference between initial and final weight. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), n = 15 animals/group

Notes: C: control group (receiving standard chow); OB: obesity group (receiving hypercaloric diet)

(*) Significant differences between groups (Student's t -test, $p = 0.05$)

Table 1: Effect of obesity on the open field test. The following variables were evaluated: latency to leave the first quadrant (time in seconds); number of line crossings (i.e., horizontal activity), outer and inner crossings; grooming (time in seconds); number of rearing behaviors (i.e., vertical activity); and number of fecal droppings. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), n = 15 animals/group

Notes: C: control group (receiving standard chow); OB: obesity group (receiving hypercaloric diet)

(*) Significant differences between groups (Student's t -test, $p = 0.05$)

Table 2: Effect of obesity on the elevated plus maze test. The following variables were evaluated: number of protected head-dips (PHD), number of non-protected head-dips (NPHD), number of entries into the open (EOA) and closed arms (ECA) of the maze, time spent in the open arms (TOA), time

spent in the closed arms (TCA), time spent grooming, number of rearings, and number of fecal droppings. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), $n = 15$ animals/group

Notes: C: control group (receiving standard chow); OB: obesity group (receiving hypercaloric diet)

(*) Significant differences between groups (Student's t -test, $p = 0.05$)

Figure 3, panel A, B and C: Hippocampal BDNF levels, cell damage, and cell viability. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), $n = 15$ animals/group

Notes: C: control group (receiving standard chow); OB: obesity group (receiving hypercaloric diet)

(*) Significant difference from the control group (Student's t -test, ($p = 0.04$))

([#]) Effect of H_2O_2 or (*) obesity on LDH leakage (two-way ANOVA/Bonferroni test, $P = 0.006$ and $p = 0.03$ respectively)

([#]) Effect of H_2O_2 (Two way ANOVA/Bonferroni test, $p = 0.001$)

Figures

Figure 1, Panel A

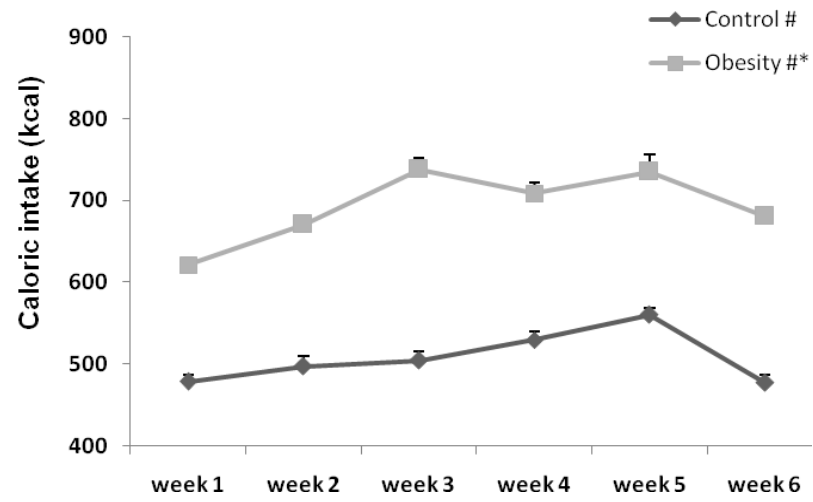


Figure 1, Panel B

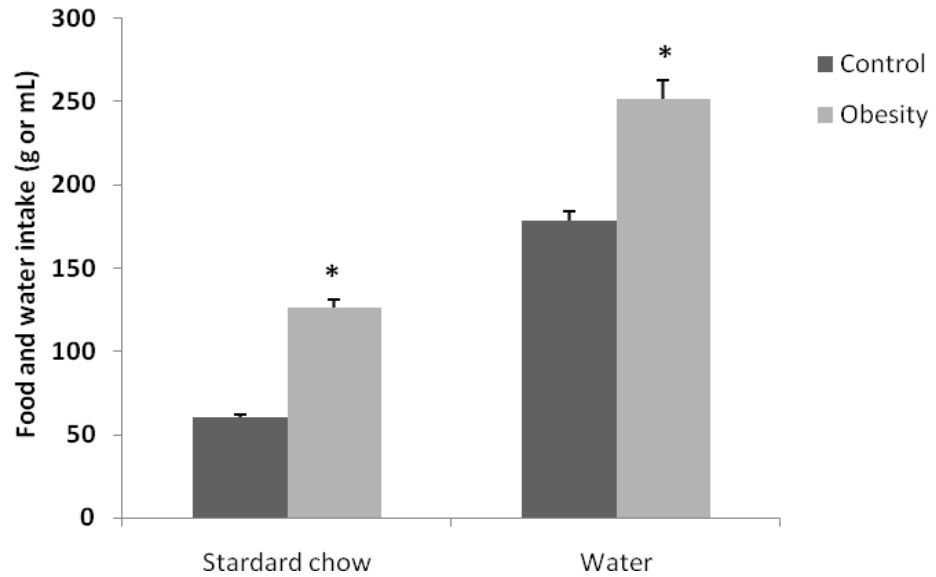


Figure 1, Panel C

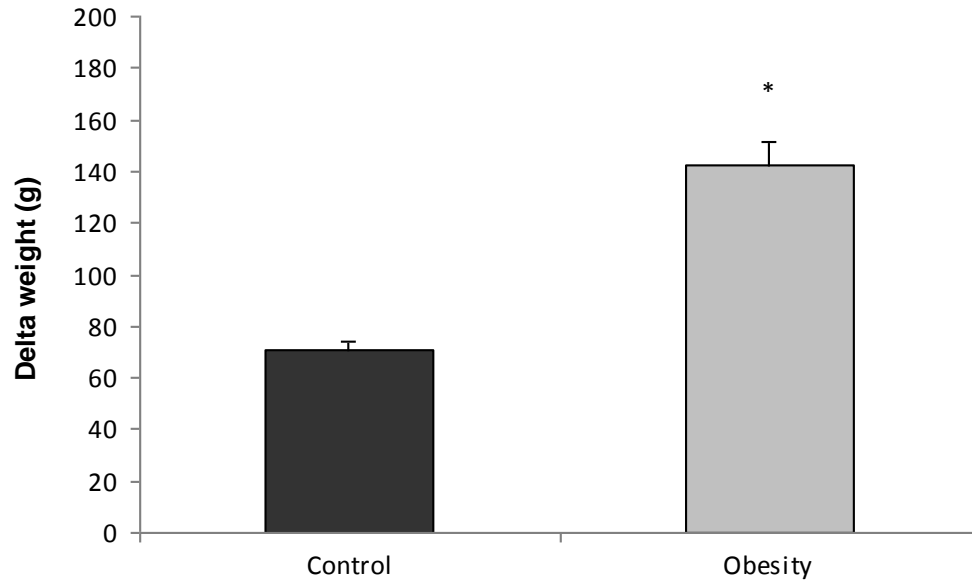


Table 1

Behavior	Control	Obesity
	Median (min-max)	Median (min-max)
Latency (s)	4.0 (1.0-9.0)	6.0 (1.0-15.0)
Outer crossings (n)	62.0 (30.0-74.0)	66.0 (47.0-98.0)*
Inner crossings (n)	3.0 (0.0-9.0)	3.0 (0.0-8.0)
Total crossings (n)	65.0 (35.0-101.0)	104.0 (54.0-150.0)*
Rearings (n)	16.0 (3.0-33.0)	21.0 (12.0-34.0)*
Grooming (s)	44.0 (0.0-90.0)	62.0 (0.0-133.0)
Fecal droppings (n)	3.0 (1.0-7.0)	4.0 (1.0-8.0)

Note: Mann-Whitney with median (minimum-maximum). Effect of obesity on outer crossings (*) ($P < 0.03$) and rearings (*) ($p = 0.02$); (n): number of events; (s): seconds.

Table 2

Behavior	Control	Obesity
	Median (min-max)	Median (min-max)
PHD (n)	1.0 (0.0-4.0)	1.0 (0.0-5.0)
NPHD (n)	3.0 (0.0-10.0)	2.0(0.0-10.0)
EOA (n)	2.0 (0.0-5.0)	2.0(0.0-5.0)
ECA (n)	3.0 (1.0-11.0)	4.0 (0.0-9.0)
TOA (s)	14.0 (6.0-52.0)	22.0 (0.0-52.0)
TCA (s)	259.0 (233.0-296.0)	244.0 (218.0-286.0)
Grooming (s)	32.0 (17.0-83.0)	35.0 (14.0-72.0)
Rearings (n)	9.0 (6.0-20.0)	29.0 (12.0-57.0)*
Fecal droppings (n)	2.0 (0.0-5.0)	2.0 (0.0-5.0)

Note: Mann-Whitney with median (minimum-maximum). Effect of obesity on rearings (*) ($p < 0.0001$); (n): number of events; (s): seconds.

Figure 3, Panel A

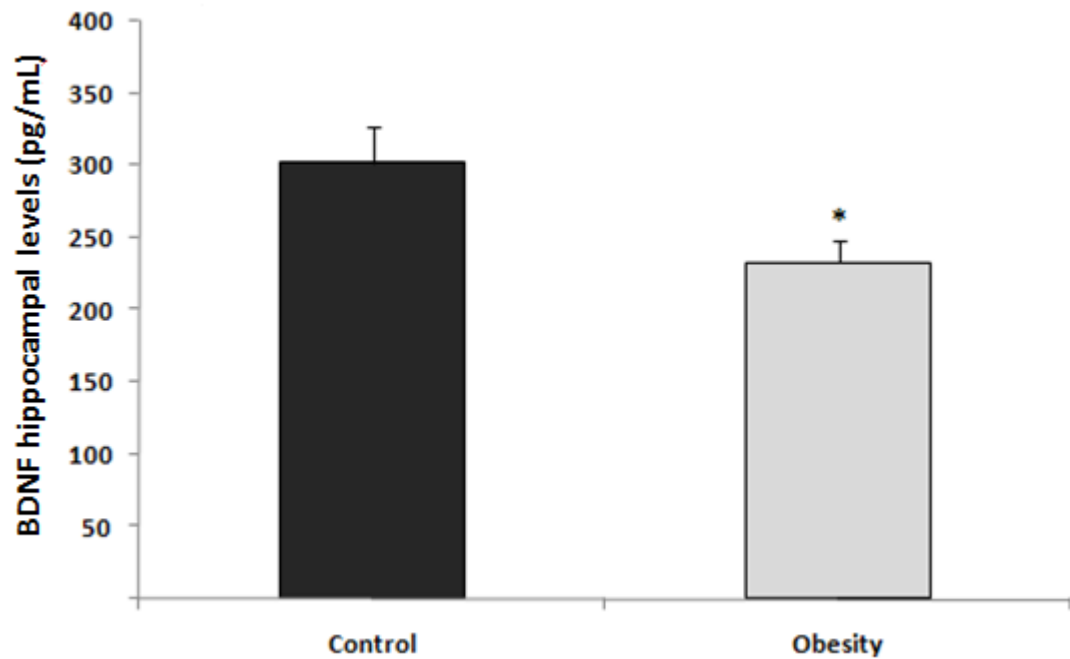


Figure 3, Panel B

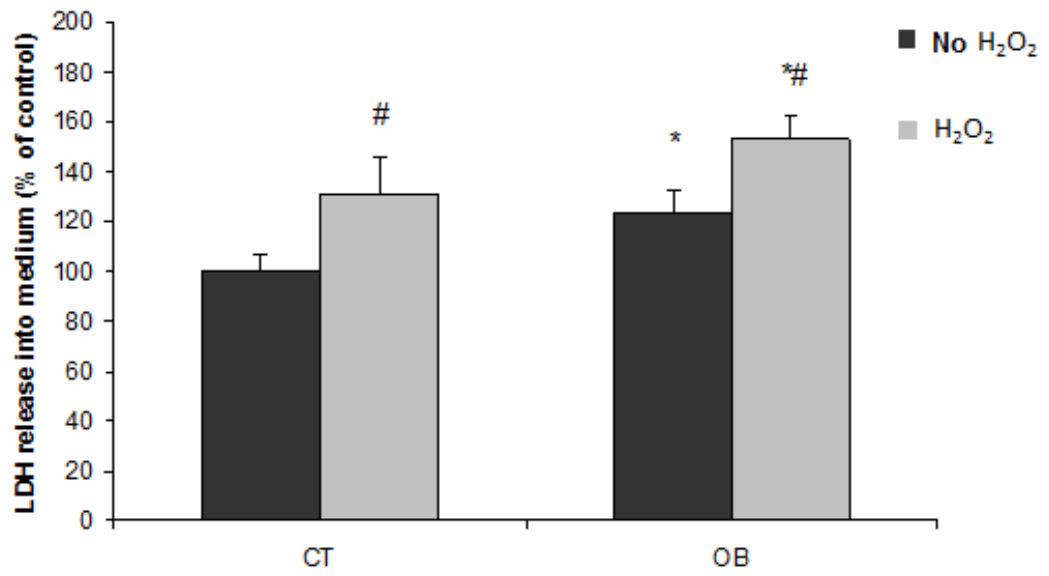
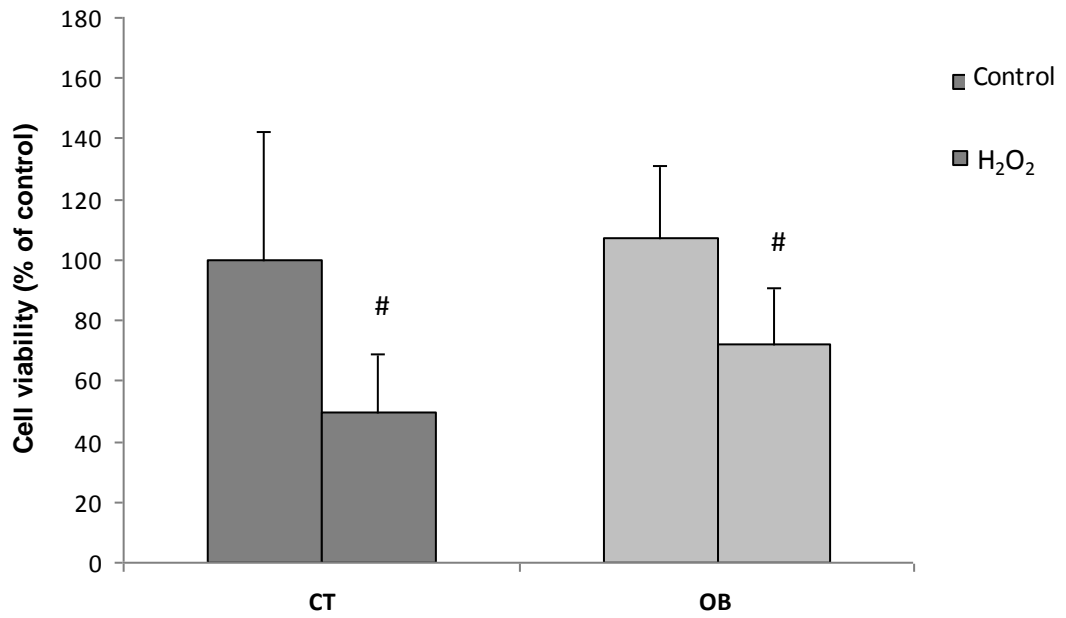


Figure 3, Panel C



References

- Almli, L. M., S. E. Hamrick, et al. (2001). "Multiple pathways of neuroprotection against oxidative stress and excitotoxic injury in immature primary hippocampal neurons." *Brain Res Dev Brain Res* 132(2): 121-129.
- Autry, A. E. and L. M. Monteggia (2012). "Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders." *Pharmacol Rev* 64(2): 238-258.
- Banks, W. A., C. M. Clever, et al. (2000). "Partial saturation and regional variation in the blood-to-brain transport of leptin in normal weight mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278(6): E1158-1165.
- Beckers, S., A. Peeters, et al. (2008). "Association of the BDNF Val66Met variation with obesity in women." *Mol Genet Metab* 95(1-2): 110-112.
- Bianchin, M., R. Walz, et al. (1993). "Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or the amygdala up to 20 days after training." *Behav Neural Biol* 59(2): 83-86.
- Bohm, A., A. M. Ordelheide, et al. (2012). "Common genetic variation in the SERPINF1 locus determines overall adiposity, obesity-related insulin resistance, and circulating leptin levels." *PLoS One* 7(3): e34035.
- Burns, B., K. Schmidt, et al. (2010). "Rai1 haploinsufficiency causes reduced Bdnf expression resulting in hyperphagia, obesity and altered fat distribution in mice and humans with no evidence of metabolic syndrome." *Hum Mol Genet* 19(20): 4026-4042.
- Carlini, V. P., M. E. Monzon, et al. (2002). "Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats." *Biochem Biophys Res Commun* 299(5): 739-743.
- Cenquizca, L. A. and L. W. Swanson (2007). "Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex." *Brain Res Rev* 56(1): 1-26.
- Cohen, A. D. and W. E. Klunk (2014). "Early detection of Alzheimer's disease using PiB and FDG PET." *Neurobiol Dis*.
- Dunbar, J. A., P. Reddy, et al. (2008). "Depression: an important comorbidity with metabolic syndrome in a general population." *Diabetes Care* 31(12): 2368-2373.
- Estadella, D., L. M. Oyama, et al. (2004). "Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats." *Nutrition* 20(2): 218-224.
- Francis, H. M. and R. J. Stevenson (2011). "Higher reported saturated fat and refined sugar intake is associated with reduced hippocampal-dependent memory and sensitivity to interoceptive signals." *Behav Neurosci* 125(6): 943-955.
- Fridlyand, L. E. and L. H. Philipson (2006). "Reactive species, cellular repair and risk factors in the onset of type 2 diabetes mellitus: review and hypothesis." *Curr Diabetes Rev* 2(2): 241-259.
- Furukawa, S., T. Fujita, et al. (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." *J Clin Invest* 114(12): 1752-1761.
- Greenwood, C. E. and G. Winocur (1990). "Learning and memory impairment in rats fed a high saturated fat diet." *Behav Neural Biol* 53(1): 74-87.
- Higgs, S. (2005). "Memory and its role in appetite regulation." *Physiol Behav* 85(1): 67-72.

- Jurdak, N. and R. B. Kanarek (2009). "Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats." *Physiol Behav* 96(1): 1-5.
- Kernie, S. G., D. J. Liebl, et al. (2000). "BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice." *EMBO J* 19(6): 1290-1300.
- Koga, S., A. Kojima, et al. (2014). "Effects of diet-induced obesity and voluntary exercise in a tauopathy mouse model: implications of persistent hyperleptinemia and enhanced astrocytic leptin receptor expression." *Neurobiol Dis* 71: 180-192.
- Koh, J. Y. and D. W. Choi (1987). "Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay." *J Neurosci Methods* 20(1): 83-90.
- Lathe, R. (2001). "Hormones and the hippocampus." *J Endocrinol* 169(2): 205-231.
- Lenard, N. R. and H. R. Berthoud (2008). "Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes." *Obesity (Silver Spring)* 16 Suppl 3: S11-22.
- Liao, G. Y., J. J. An, et al. (2012). "Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin." *Nat Med* 18(4): 564-571.
- Lister, R. G. (1990). "Ethologically-based animal models of anxiety disorders." *Pharmacol Ther* 46(3): 321-340.
- Lu, Y., K. Christian, et al. (2008). "BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory?" *Neurobiol Learn Mem* 89(3): 312-323.
- Luchsinger, J. A., M. X. Tang, et al. (2002). "Caloric intake and the risk of Alzheimer disease." *Arch Neurol* 59(8): 1258-1263.
- Lynn, D. A. and G. R. Brown (2009). "The ontogeny of exploratory behavior in male and female adolescent rats (*Rattus norvegicus*)." *Dev Psychobiol* 51(6): 513-520.
- Macedo, I. C., L. F. Medeiros, et al. (2012). "Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels." *Peptides* 38(1): 189-196.
- Maesako, M., K. Uemura, et al. (2012). "Environmental enrichment ameliorated high-fat diet-induced Abeta deposition and memory deficit in APP transgenic mice." *Neurobiol Aging* 33(5): 1011 e1011-1023.
- Molteni, R., R. J. Barnard, et al. (2002). "A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning." *Neuroscience* 112(4): 803-814.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Murray, S., A. Tulloch, et al. (2014). "Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity." *Nat Rev Endocrinol* 10(9): 540-552.
- Nin, M. S., N. S. Couto-Pereira, et al. (2012). "Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests." *Eur J Pharmacol* 684(1-3): 95-101.
- Noble, E. E., C. J. Billington, et al. (2011). "The lighter side of BDNF." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(5): R1053-1069.
- Pandit, R., J. W. de Jong, et al. (2011). "Neurobiology of overeating and obesity: the role of melanocortins and beyond." *Eur J Pharmacol* 660(1): 28-42.

- Pannacciulli, N., A. Del Parigi, et al. (2006). "Brain abnormalities in human obesity: a voxel-based morphometric study." *Neuroimage* 31(4): 1419-1425.
- Parent, M. B., J. N. Darling, et al. (2014). "Remembering to eat: hippocampal regulation of meal onset." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 306(10): R701-713.
- Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, et al. (1995). "Characteristics of BDNF-induced weight loss." *Exp Neurol* 131(2): 229-238.
- Petrovich, G. D. and M. Gallagher (2007). "Control of food consumption by learned cues: a forebrain-hypothalamic network." *Physiol Behav* 91(4): 397-403.
- Rios, M. (2013). "BDNF and the central control of feeding: accidental bystander or essential player?" *Trends Neurosci* 36(2): 83-90.
- Rios, M., G. Fan, et al. (2001). "Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity." *Mol Endocrinol* 15(10): 1748-1757.
- Roesler, R., R. Walz, et al. (1999). "Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C)." *Brain Res Mol Brain Res* 71(2): 349-353.
- Rolls, E. T. (2008). "Functions of the orbitofrontal and pregenual cingulate cortex in taste, olfaction, appetite and emotion." *Acta Physiol Hung* 95(2): 131-164.
- Rothman, S. M., K. J. Griffioen, et al. (2012). "Brain-derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health." *Ann N Y Acad Sci* 1264: 49-63.
- Ruperez, A. I., A. Gil, et al. (2014). "Genetics of oxidative stress in obesity." *Int J Mol Sci* 15(2): 3118-3144.
- Sampey, B. P., A. M. Vanhoose, et al. (2011). "Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet." *Obesity (Silver Spring)* 19(6): 1109-1117.
- Silveira, P. P., A. K. Portella, et al. (2005). "The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior." *Int J Dev Neurosci* 23(1): 93-99.
- Sinha, J. K., S. Ghosh, et al. (2014). "Increased macromolecular damage due to oxidative stress in the neocortex and hippocampus of WNIN/Ob, a novel rat model of premature aging." *Neuroscience* 269: 256-264.
- Siqueira, I. R., V. R. Elsner, et al. (2011). "Ascorbate uptake is decreased in the hippocampus of ageing rats." *Neurochem Int* 58(4): 527-532.
- Solfrizzi, V., A. D'Introno, et al. (2005). "Dietary fatty acids intake: possible role in cognitive decline and dementia." *Exp Gerontol* 40(4): 257-270.
- South, T., N. M. Holmes, et al. (2014). "Rats eat a cafeteria-style diet to excess but eat smaller amounts and less frequently when tested with chow." *PLoS One* 9(4): e93506.
- Spruijt, B. M., J. A. van Hooff, et al. (1992). "Ethology and neurobiology of grooming behavior." *Physiol Rev* 72(3): 825-852.
- Treit, D., M. L. Spetch, et al. (1983). "Variety in the flavor of food enhances eating in the rat: a controlled demonstration." *Physiol Behav* 30(2): 207-211.

- Tyler, W. J., M. Alonso, et al. (2002). "From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning." *Learn Mem* 9(5): 224-237.
- Unger, T. J., G. A. Calderon, et al. (2007). "Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity." *J Neurosci* 27(52): 14265-14274.
- Wang, C., R. J. Godar, et al. (2010). "Chronic administration of brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus reverses obesity induced by high-fat diet." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298(5): R1320-1332.
- Wang, Y., HeJ., Kastin A.J. et al. (2013). Hypersomnolence and reduced activity in pan-leptin receptor knockout mice. *J Mol Neurosci* 51(3): 1038-45
- Wells, C. E., B. Krikke, et al. (2009). "Changes to open field surfaces typically used to elicit hippocampal remapping elicit graded exploratory responses." *Behav Brain Res* 197(1): 234-238.
- Xu, B., E. H. Goulding, et al. (2003). "Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor." *Nat Neurosci* 6(7): 736-742.
- Yeo, G. S., C. C. Connie Hung, et al. (2004). "A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay." *Nat Neurosci* 7(11): 1187-1189.
- Yu, Y., Q. Wang, et al. (2009). "Energy-restricted pair-feeding normalizes low levels of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B mRNA expression in the hippocampus, but not ventromedial hypothalamic nucleus, in diet-induced obese mice." *Neuroscience* 160(2): 295-306.

7.2 Segundo protocolo experimental

7.2.1 Artigo publicado pelo *Neuropeptides Journal (ELSEVIER)*

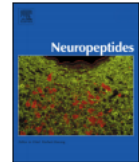
Neuropeptides 51 (2015) 75–81



Contents lists available at ScienceDirect

Neuropeptides

journal homepage: www.elsevier.com/locate/npep



Chronic stress associated with hypercaloric diet changes the hippocampal BDNF levels in male Wistar rats



I.C. Macedo^{a,b,c}, J.R. Rozisky^{a,c,d}, C. Oliveira^{a,c,d}, C.M. Oliveira^{a,c,d}, G. Laste^{a,c,d}, Y. Nonose^{a,c}, V.S. Santos^{a,c}, P.R. Marques^{a,c,d}, M.F.M. Ribeiro^{b,e}, W. Caumo^d, I.L.S. Torres^{a,b,c,d,*}

^a Pain Pharmacology and Neuromodulation Laboratory: Animal Models, Department of Pharmacology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Institute of Basic Health Sciences, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

^b Graduate Program in Biological Sciences – Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Institute of Basic Health Sciences, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

^c Animal Experimentation Unit and Graduate Research Group, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

^d Graduate Program in Medical Sciences – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

^e Neuro-Humoral Interaction Laboratory, Department of Physiology – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2014

Accepted 21 January 2015

Available online 12 February 2015

Keywords:

Anhedonia

BDNF

Chronic stress

Obesity

Hippocampus

Hypothalamus

ABSTRACT

Chronic stress, whether associated with obesity or not, leads to different neuroendocrine and psychological changes. Obesity or being overweight has become one of the most serious worldwide public health problems. Additionally, it is related to a substantial increase in daily energy intake, which results in substituting nutritionally adequate meals for snacks. This metabolic disorder can lead to morbidity, mortality, and reduced quality of life. On the other hand, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is widely expressed in all brain regions, particularly in the hypothalamus, where it has important effects on neuroprotection, synaptic plasticity, mammalian food intake-behavior, and energy metabolism. BDNF is involved in many activities modulated by the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis. Therefore, this study aims to evaluate the effect of obesity associated with chronic stress on the BDNF central levels of rats. Obesity was controlled by analyzing the animals' caloric intake and changes in body weight. As a stress parameter, we analyzed the relative adrenal gland weight. We found that exposure to chronic restraint stress during 12 weeks increases the adrenal gland weight, decreases the BDNF levels in the hippocampus and is associated with a decrease in the caloric and sucrose intake, characterizing anhedonia. These effects can be related stress, a phenomenon that induces depression-like behavior. On the other hand, the rats that received the hypercaloric diet had an increase in caloric intake and became obese, which was associated with a decrease in hypothalamus BDNF levels.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Obesity is a serious health problem with an increasing incidence in developed and developing countries. According to global estimates, the prevalence of obesity in Western societies continues to increase dramatically, and current estimates suggest that more than 30% of adults in the United States are obese (Flegal et al., 2012). Defined as an excessive accumulation of body fat, obesity results from the imbalance between the caloric intake and energy expenditure (Bartolomucci et al., 2009; Choquet and Meyre, 2011). Stress exposure may be the most important environmental factor affecting feeding behavior, metabolism, and neuroendocrine functions (Kormos and Gaszner, 2013; Patterson et al., 2013). Excessive or

chronic stress can trigger or exacerbate many other diseases and disorders, including mood disorders, such as post-traumatic stress disorder, anxiety, and depression (McEwen, 2008). The combination of obesity and stress can trigger dysregulation of related neuroendocrine axes as well as disrupt the control of feeding and metabolic or cardiovascular dysfunctions, among others (Pasquali, 2012).

Chronic stress influences feeding behaviors and energy homeostasis and can lead to depression-like behaviors such as anhedonia, which is considered the main symptom of human depression; this can be reproduced in animal models through decreased consumption of palatable solutions (Der-Avakian and Markou, 2012; Willner et al., 1987). Research has shown that chronic stress promotes the consumption of palatable and energy-dense (comfort) foods and elevates sugar consumption, leading to obesity in animal models (Adam and Epel, 2007; Pecoraro et al., 2004) and humans (Tryon et al., 2013). The neural mechanisms recruited by stress are complex and involve different nuclei of the hypothalamus. Additionally,

* Corresponding author. Departamento de Farmacologia – ICBS, UFRGS, Rua Sarmento Leite, 500 sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.
E-mail address: 87605@ufrgs.br (I.L.S. Torres).

dysfunctions in these areas may be associated with disordered eating, obesity, and addiction behaviors (Jastreboff et al., 2011). The complex process that drives feeding behaviors involves orexigenic and anorexigenic peptides synthesized and released in several nuclei of the hypothalamus (Hillebrand et al., 2002; Suzuki et al., 2012). These peptides receive information from hormones from the adipose tissue and gastrointestinal tract, such as leptin, ghrelin, and insulin, among others (Woods and D'Alessio, 2008).

BDNF, a neurotrophin that is widely expressed in the central and peripheral nervous system (Hohn et al., 1990; Leibrock et al., 1989), has an important role in the control of energy homeostasis and body weight, modulating the activity of neuropeptides involved in food intake (Pellemounter et al., 1995). Studies have indicated that different regulators of appetite, such as leptin, insulin, and pancreatic polypeptide, potentially exert anorexigenic effects through BDNF (Rosas-Vargas et al., 2011). In the adult central nervous system, BDNF displays a widespread distribution pattern on structures such as the hippocampus, amygdala, hypothalamus and cerebral cortex (Pruunsild et al., 2007). Classically, BDNF binds the tyrosine kinase B (TrkB) receptor and promotes neuronal survival and neurite outgrowth in addition to maintaining synaptic connectivity in the adult nervous system (Baydyuk and Xu, 2014). The decrease in the BDNF levels, with the consequent decrease in hippocampal neuroplasticity, has been linked to the pathogenesis of depression (Duman and Monteggia, 2006; Malberg and Schechter, 2005).

Considering the need to understand neurochemical effects that underlie stress-induced eating disorders and the importance of BDNF on the central regulation of energy metabolism, this study aims to evaluate the anhedonic behavior and BDNF central levels of animals exposed to chronic stress and a hypercaloric diet.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Thirty-two male Wistar rats, aged 60 days and weighting 200–250 g, were randomized by weight and housed in cages made of polypropylene material and measuring 49 × 34 × 16 cm. Animals were maintained on a standard 12-hour light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m. and lights off at 7:00 p.m.), in a temperature-controlled environment (22 ± 2 °C), with *ad libitum* access to water and chow (standard rat chow and/or cafeteria diet). The protocol for this experimental study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, which is the institution where the work was conducted, under protocol number GPPG-HCPA 11–0455. The protocol was compliant with the Brazilian guidelines on the use of animals in research (Law No. 11,794). Animal handling and all experiments were performed in accordance with international guidelines for animal welfare, and measures were taken to minimize animal pain and discomfort. The minimum number of animals required to produce reliable scientific data was used.

2.2. Experimental design

Fig. 1 illustrates the study's experimental design. Rats were acclimatized to their environment for 1 week before the start of the experiment. Animals were housed in groups of four per cage. After 1 week, they were divided into four groups in accordance with the stress procedure and diet: control-standard chow (C), hypercaloric diet (HD), standard chow plus restraint stress (S), and hypercaloric diet plus restraint stress (SHD). The time duration of restraint stress was 12 weeks. Animals were weighed weekly, and food intake was recorded daily. At 24 hours after the final stress session and after 12-hour fast, animals were killed by decapitation and tissue samples were removed and frozen at –70 °C for later BDNF analysis. The hypothalamus, prefrontal cortex, and hippocampus were structures related to feeding behavior, metabolism, and depression-like behavior.

2.3. Stress procedure

Stress was performed according to a previously described chronic restraint stress model. This model uses a 25 × 7 cm plastic tube fixed with adhesive tape on the outside to avoid discomfort and designed to limit animal movements, and one end of the tube was open to allow for breathing. Animals were exposed daily to 1 hour of stress in the morning (between 9:00 and 12:00 a.m.), 5 days a week for 12 weeks (no stress on weekends). Animals were returned to their home cages immediately after exposure to the 1 hour of stress. Control animals were maintained in their home cages throughout the experimental period. The apparatus was ventilated to avoid physical compression, hyperthermia, and sweating (Ely et al., 1997).

2.4. Experimental diets

The palatable high-calorie diet (cafeteria diet) was chosen according to our previous study (Macedo et al., 2012), and this diet model mimics modern patterns of human food consumption and has been used successfully in other experimental studies to induce obesity in lean animals (Estadella et al., 2004; Kumar et al., 2011). This diet was adapted from a diet known as the cafeteria diet or Western diet, which was previously described (Estadella et al., 2004). Foods included in the cafeteria diet were crackers, wafers, sausages, chips, condensed milk, and soda. Both the standard chow and the experimental diet were replaced daily with fresh food. Animals receiving the hypercaloric diet also had access to standard chow and water. The standard rat diet (Nuvilab CR-1, NUVITAL®, Curitiba, PR, Brazil) consisted of 55.0% carbohydrates, 22.0% protein, 4.5% lipids, and 18.5% other constituents (fiber and vitamins), totaling 2.93 kcal/g (information provided by the manufacturer). The palatable high-calorie diet (cafeteria diet) consisted of approximately 60.0% carbohydrates, 20.0% lipids, 15.0% protein, and 5.0% other constituents (sodium, calcium, vitamins, preservatives, minerals, etc.).

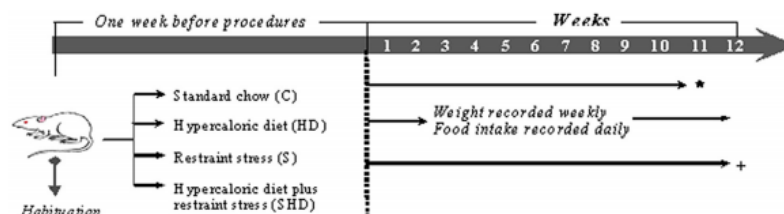


Fig. 1. Experimental design.

2.5. Caloric intake, change in body weight and relative adrenal gland weight

The standard and hypercaloric foods were weighed daily in the morning to control the consumption per box. Using a digital scale, the daily food consumption (in grams) was calculated for each cage (amount of food placed in the feeders minus the remaining food) and averaged for a week (total food consumption). To estimate the consumption for each animal, the total food consumption was multiplied by the animal weight (in grams) and divided by the total sum of weights for all animals in its cage, converting to an approximate value of individual consumption. The analyses of the consumption were calculated according to the type of diet offered, the standard chow (standard rat diet 2.93 kcal/g) or hypercaloric diet (cafeteria diet 4.18 kcal/g). Animals were weighed weekly, and the change in body weight was calculated by the difference between the final and baseline weights. Adrenal glands were carefully dissected and weighed. The adrenals were weighed on a precision balance using a scale with a precision of 0.0001 g (Nyuyuki et al., 2012). The data were expressed as grams of tissue per 100 g of body weight (weight tissue/bodyweight \times 100).

2.6. Sucrose preference test

Rats were adapted to a 10% sucrose solution (w/v) 3 days before the sucrose preference test. For adaptation, animals received water and 10% sucrose solution (two separate bottles) for 1 hour, after 20 h of deprivation of food and water. For the final test of anhedonia, the same procedure was carried out to monitor the level of sucrose consumed in 1 hour. For this purpose, 200 mL of water or sucrose solution was placed in each bottle, and the remaining level of water and sucrose solution was measured in a test tube (adapted from Bachis et al., 2008; Moreau et al., 1994).

2.7. Analysis of BDNF immunocontent

BDNF levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the ChemKine kit (Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The results are expressed as the percentage of BDNF levels for the different brain structures.

2.8. Statistical analysis

Data and interactions were evaluated by two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, which was followed by a Bonferroni's multiple comparison test in the case of caloric intake and by two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test in the case of other evaluations. In both tests, the hypercaloric diet or obesity and chronic stress were used as two independent variables. All results are expressed as the mean \pm standard error of the mean, and differences between groups were considered significant if $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Caloric intake (kcal)

The results of the two-way ANOVA for repeated measures demonstrated that there was an effect of time ($F_{(11,30)} = 23.726$, $P = 0.001$) because the animals showed changes in this parameter over time. While the chronic stress decreased ($F_{(1,14)} = 5.776$, $P = 0.02$), the hypercaloric diet significantly increased the caloric intake over time ($F_{(11,4)} = 2.447$, $P = 0.001$). There were interactions between stress and hypercaloric diet factors ($F_{(1,22)} = 16.833$, $P = 0.001$); while the chronic stress decreased the caloric intake, obesity increased this parameter. There were interactions between time and chronic stress ($F_{(11,4)} = 3.801$, $P < 0.05$), showing that while time increase the caloric intake, stress had the opposite effect. Additionally, there are interactions between time and hypercaloric diet ($F_{(11,4)} = 20.641$, $P = 0.001$) because both parameters increase the caloric intake (Fig. 2).

3.2. Change in the body weight ($\Delta = \text{final weight} - \text{initial weight}$) and adrenal gland weight

There were no significant between-group differences in the baseline weight (one-way ANOVA, $F_{(3,30)} = 0.112$, $P > 0.05$, data not shown). Two-way ANOVA showed that chronic stress had no effect on the animal weight during treatment ($F_{(1,14)} = 0.864$, $P > 0.05$), but the hypercaloric diet significantly increased this parameter ($F_{(1,30)} = 10.564$, $P = 0.003$) (Fig. 3A). Moreover, the two-way ANOVA

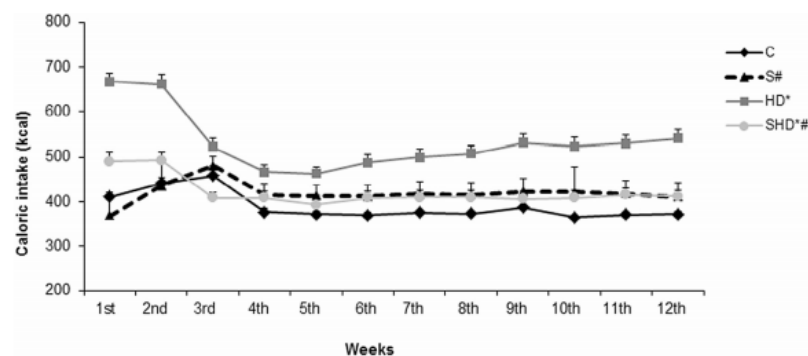


Fig. 2. Caloric intake (kcal). All results are expressed as the mean \pm standard error of the mean with $n = 8$ animals/group. C: control group (receiving standard chow alone); S: standard chow + restraint stress; HD: hypercaloric diet; and SHD: hypercaloric diet + restraint stress. There was an effect of time (two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, $P < 0.001$). (*) Significant effect of hypercaloric diet (two-way ANOVA for repeated measures/Bonferroni's test, $P = 0.001$). (#) Significant effect of chronic stress (two-way ANOVA for repeated measures, $P = 0.02$). There was an interaction between the stress and hypercaloric diet (two-way ANOVA, $P = 0.001$). There was an interaction between the time and stress (two-way ANOVA for repeated measures/Bonferroni's test, $P < 0.05$). There was an interaction between time and hypercaloric diet (two-way ANOVA for repeated measures/Bonferroni's test, $P = 0.001$). There was an interaction between time, stress, and hypercaloric diet (two-way ANOVA for repeated measures/Bonferroni's test, $P < 0.05$).

78

I.C. Macedo et al./Neuropeptides 51 (2015) 75–81

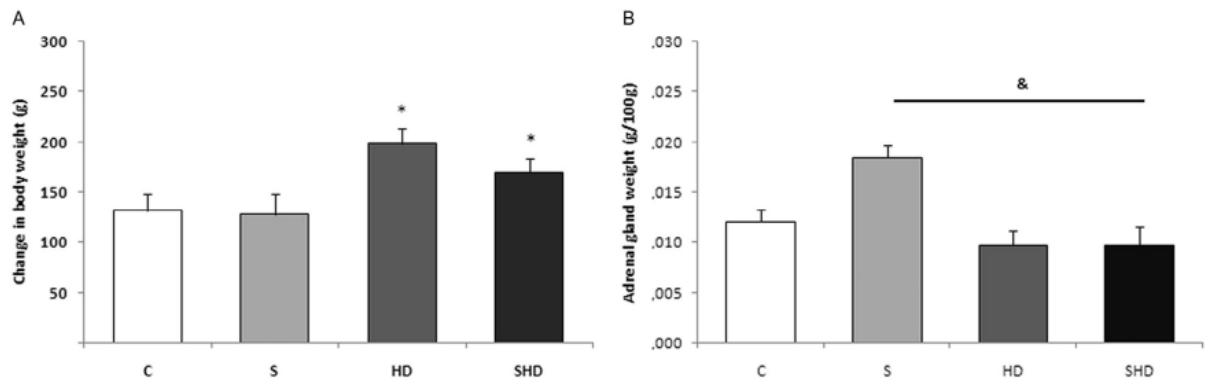


Fig. 3. (A) Change in body weight (g). All results are expressed as the mean \pm standard error of the mean with $n = 8$ animals/group. C: control group (receiving standard chow alone); S: standard chow + restraint stress; HD: hypercaloric diet; and SHD: hypercaloric diet + restraint stress. (*) Significant effect of hypercaloric diet (two-way analysis of variance/Bonferroni's test, $P = 0.003$). (B) Relative adrenal gland weight (g/100 g). All results are expressed as the mean \pm standard error of the mean with $n = 8$ animals/group. C: control group (receiving standard chow alone); S: standard chow + restraint stress; HD: hypercaloric diet; and SHD: hypercaloric diet + restraint stress. (*) Significant effect of chronic stress (two-way analysis of variance/Bonferroni's test, $P = 0.003$).

showed a chronic stress increase of the adrenal gland weight ($F_{(1,14)} = 5.288$, $P = 0.02$), but the obesity and hypercaloric diet did not ($F_{(1,14)} = 6.197$, $P = 0.01$) ($F_{(1,14)} = 4.182$, $P = 0.05$) (Fig. 3B).

3.3. Sucrose preference test

For the sucrose preference test, we observed that chronic stress reduced the food intake of the sucrose solution ($F_{(1,14)} = 7.026$, $P = 0.01$), but obesity did not ($F_{(1,14)} = 0.161$, $P > 0.05$). Additionally, there was an interaction between stress and obesity ($F_{(2,22)} = 0.006$, $P = 0.05$) in sucrose intake (Fig. 4); while the chronic stress decreased the food intake of the sucrose solution, obesity tended to increase this intake.

3.4. Central BDNF levels

In the prefrontal cortex, there were no effects of obesity ($F_{(1,14)} = 0.082$, $P > 0.05$) or chronic stress ($F_{(1,14)} = 0.264$, $P > 0.05$) on BDNF levels, and there was no interaction between these two independent factors ($F_{(2,22)} = 1.500$, $P > 0.05$) (two-way ANOVA/

Bonferroni's test) (Fig. 5). On the other hand, we observed that the chronic stress significantly decreased the BDNF levels in the hippocampus ($F_{(1,14)} = 4.231$, $P = 0.05$), but obesity did not affect the BDNF levels in this structure ($F_{(1,14)} = 1.782$, $P > 0.05$). Additionally, there was an interaction between stress and obesity ($F_{(2,22)} = 5.467$, $P = 0.02$) (two-way ANOVA/Bonferroni's test) (Fig. 5). In the hypothalamus, obesity significantly decreased BDNF levels ($F_{(1,14)} = 10.924$, $P = 0.003$), but there was no effect of chronic stress ($F_{(1,14)} = 0.01$, $P > 0.05$) nor an interaction between these independent factors ($F_{(2,22)} = 2.207$, $P > 0.05$) (two-way ANOVA/Bonferroni's test) (Fig. 5).

4. Discussion

This study showed that obesity induces a decrease in the hypothalamus BDNF levels, while exposure to chronic restraint leads to a decrease in hippocampus BDNF levels, which is associated with a reduction in the calorie and sucrose intakes, characterizing anhedonic behavior. These results corroborate the depression neuroplasticity hypothesis that is based on the decrease in BDNF levels (Malberg and Schechter, 2005). Additionally, decreased

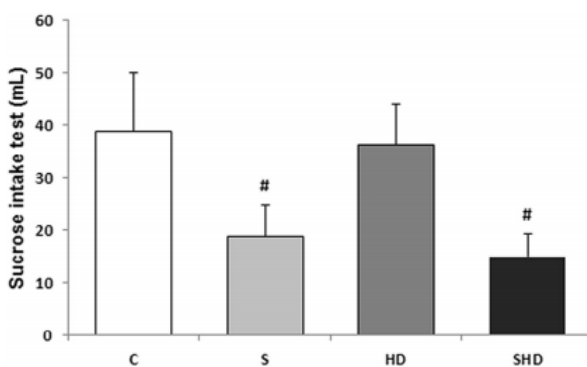


Fig. 4. Sucrose preference test (mL). All results are expressed as the mean \pm standard error of the mean with $n = 8$ animals/group. C: control group (receiving standard chow alone); S: standard chow + restraint stress; HD: hypercaloric diet; and SHD: hypercaloric diet + restraint stress. (#) Significant effect of chronic stress (two-way analysis of variance (ANOVA)/Bonferroni's test, $P = 0.01$). There was an interaction between chronic stress and hypercaloric diet (two-way ANOVA/Bonferroni's test, $P = 0.05$).

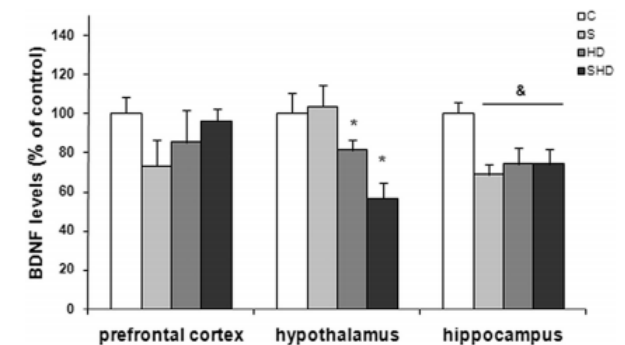


Fig. 5. Brain-derived neurotrophic factor levels in central structures. Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean with $n = 6-8$ animals/group. C: control group (receiving standard chow alone); S: control + restraint stress; HD: hypercaloric diet; and SHD: hypercaloric diet + restraint stress. (*) Significant effect of obesity (two-way analysis of variance (ANOVA)/Bonferroni's test, $P = 0.003$). (#) Significant effect of chronic stress (two-way ANOVA/Bonferroni's test, $P = 0.05$). (&) Interaction between chronic stress and hypercaloric diet (two-way ANOVA/Bonferroni's test, $P = 0.02$).

neuroplasticity in the hippocampus has recently gained importance as a likely factor in the pathogenesis of depression (Duman and Monteggia, 2006). The infusion of BDNF in the brain (Hoshaw et al., 2005; Siuciak et al., 1997), more specifically in the hippocampus (Shirayama et al., 2002; Ye et al., 2011), and also peripherally (Schmidt and Duman, 2010), produces antidepressant-like effects. On the other hand, some antidepressants can up-regulate hippocampal BDNF (Duman and Monteggia, 2006). This result can be achieved after acute (1, 5 and 24 h) (Tamburella et al., 2009), sub-chronic (7 days) or chronic (14 and 21 days) antidepressant treatment (Larsen et al., 2008; Zaben and Gray, 2013) through activating 5-HT₄ receptors (Lucas et al., 2007). Other studies have shown that the increase in the hippocampal BDNF levels and in mRNA protein expression (Pascual-Brazo et al., 2012; Tamburella et al., 2009) induces antidepressant effects (Calabrese et al., 2009; Duman et al., 1997, 1999). However, the BDNF level responses to stress and antidepressants are region and drug-specific (Duman and Monteggia, 2006).

Our results are in agreement with several studies that showed that stress induces anhedonia because this phenomenon is related to depression-like behavior (Briones et al., 2012; Der-Avakian and Markou, 2012; Strekalova et al., 2004). The chronic stress paradigm has the greatest etiological relevance and face validity in mimicking depression compared with other animal models, and it is one of the most largely used pre-clinical paradigms of this disorder (Strekalova et al., 2011). Depression-like behaviors can be measured by the consumption of palatable foods such as sucrose (anhedonia) (Willner et al., 1987), which is characterized by the inability to experience pleasure and is probably caused by a reduced ability to experience reward (van Heesch et al., 2013). This decline in hedonic responses may be due to insensitivity, instead of deficits, in the capacity to feel pleasure at the level of basic sensory experience (Treadway and Zald, 2011). Several mechanisms have been associated with depression behaviors, including alterations in the cortical glutamatergic neurotransmission (Witkin et al., 2007), proliferation and survival of hippocampal tissues, and important changes in the hippocampal BDNF levels (Autry and Monteggia, 2012). Additionally, the clinical phenomenology of major depression implicates other brain neurotransmitter systems in the regulation of mood, anxiety, fear, reward processing, attention, motivation, stress responses, social interaction, and neurovegetative function (Pilar-Cuellar et al., 2013). Animal and human studies have indicated that brain structures are involved in these processes (Koenigs and Grafman, 2009) because the frontal cortex and hippocampus may show loss volume in major depression (Campbell and MacQueen, 2004). Additionally, damage to the hippocampus might impair the regulation of body weight and energy homeostasis, leading to obesity because of reduced hippocampal function and plasticity (Benoit et al., 2010).

In this study, we found that the rats receiving the cafeteria diet without associated chronic stress had an increase in the calorie intake and became obese. These results are in agreement with a previous study in our group using the same chronic stress protocol for 6 weeks, demonstrating that this period was sufficient to trigger obesity in the animals and to alter parameters that can lead to metabolic disorders (Macedo et al., 2012). The components of the obesity model used were crackers, wafers, sausages, chips, condensed milk and soda, and these foods are highly palatable features, which are considered comfort foods (Berthoud et al., 2011). The intake of palatable food can be the addictive process that leads to obesity (Kenny, 2011). Moreover, our objective was to trigger hyperphagia through food that simulates the modern patterns of human food consumption.

The hypothalamus is a major center for integrating nutritionally relevant information that originates from all peripheral organs and that is mediated through circulating hormones and metabolites and/or neural pathways (Lenard and Berthoud, 2008). The

regions of the hypothalamus that regulate food intake include the arcuate (ARC), dorsomedial (DMH) (Bi et al., 2012), ventromedial (VMH) paraventricular nuclei (PVN) (Rothman et al., 2012). In these nuclei, BDNF and its high-affinity TrkB receptor are highly expressed and play a major modulatory role in controlling appetite. BDNF modulates orexigenic and anorexigenic signaling pathways (Rios, 2013). In agreement with our results, a previous study has shown that the decrease in BDNF signaling is related to obesity (Rothman and Mattson, 2013), and genetic polymorphisms related to BDNF are also associated with obesity in humans (Beckers et al., 2008; Burns et al., 2010).

Chronic stress or obesity may be associated with changes in the serum levels of leptin or corticosterone (de Oliveira et al., 2014; Macedo et al., 2012). Leptin enters the brain and interacts with neurons in the hypothalamus to suppress appetite, while corticosterone induces gluconeogenesis (Rothman et al., 2012). In a recent study, our group showed that 6 weeks of exposure to the cafeteria diet is associated with chronic stress, leading to obesity and hyperleptinemia in animals. However, this experimental design did not find any changes in the levels of corticosterone, suggesting adaptation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (Macedo et al., 2012). However, after 12 weeks of treatment, the same protocol used in this study led to severe hyperleptinemia and desynchronization in the temporal pattern of leptin release. It is a relevant result because leptin has the important function of suppressing appetite and stimulating energy expenditure (de Oliveira et al., 2014; Wang et al., 2008). Additionally, corticosterone levels were increased after 12 weeks in stressed animals and hyperresponsiveness reached its daily peak, suggesting a loss of the adaptive process of the HPA axis to chronic stress exposure (de Oliveira et al., 2014). Chronic stress can lead to increased adrenal gland size (Garcia-Iglesias et al., 2013), and in this research we observed this increase. Importantly, palatable foods that are rich in fat and carbohydrates (“comfort food”) may decrease the stress response of rats exposed to chronic stress (Pecoraro et al., 2004). Sweet fatty foods that are low in protein may also alleviate stress in vulnerable people via the enhanced function of the serotonergic system (Gibson, 2006). Conversely, humans or animals may increase their food intake following stress or negative affect (Adam and Epel, 2007; Dallman et al., 2003; Delinsky and Wilson, 2008).

However, the results on exposure to stress-related food intake are contradictory. Several studies have shown that stress can affect feeding behavior, resulting in either increased or reduced food intake. The intrinsic relationship between food and stress depends on the types of stressors, and this effect can be opposite. Chronic stress, for example, can lead to either increased consumption of palatable and rewarding foods, leading to obesity, or a diminished appetite, which results in weight loss. Moreover, exposure to a stressor associated with the intake of palatable foods can reduce signs of stress and anxiety. The different effects of stress-induced preference for palatable food can be observed in human and animal model studies, suggesting that a common neurobiological pathway may be involved in food choice and patterns of eating behavior during stress (for review, see Singh, 2014). Additionally, the glucocorticoids released in stressful situations also influence the function of leptin, stimulate leptin release from adipose tissue and reduce the sensitivity of the brain to leptin, contributing to leptin resistance (Jequier, 2002; Zakrzewska et al., 1997).

On the other hand, obesity increases the risk of depressive symptoms in men. Comorbidities related to abdominal obesity, such as diabetes and cardiovascular disease, have also been associated with depression. The specific properties of visceral fat might give rise to depression (Vogelzangs et al., 2010), which can be a consequence of an inadequate response to repeated stress and is possibly associated with a disrupted HPA response (Pasquali, 2012). In the present study, no effects of stress were observed for the increase in adipose

tissue (data not shown), but there was an effect of stress on the anhedonia test, suggesting a depression-like behavior in these animals.

5. Conclusions

In summary, chronic stress can exert deleterious effects on the hippocampus, which may have implications in the regulation of mood and may lead to depression and its comorbidities. On the other hand, obesity can be deleterious for the hypothalamus, contributing to the loss of homeostasis of food intake. Our results indicate that both depressive and feeding behaviors are involved in the BDNF signaling pathways. Further studies evaluating the signaling pathway of BDNF and its receptor during exposure to stress and obesity may result in a novel therapeutic focus for depressive and metabolic disorders.

Acknowledgements

This research was supported by the following Brazilian funding agencies: National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (Dr. ILS Torres; Dr. Caumo W); Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education – CAPES (IC de Macedo; JR Rozisky; Oliveira C, Oliveira CM; Laste G; Marques PR); and Graduate Research Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre – GPPG (ILS Torres – Grant 110455) PIBIC HCPA/CNPq.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest to report. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Adam, T.C., Epel, E.S., 2007. Stress, eating and the reward system. *Physiol. Behav.* 91 (4), 449–458.
- Autry, A.E., Monteggia, L.M., 2012. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Rev.* 64 (2), 238–258.
- Bachis, A., Cruz, M.L., et al., 2008. Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 442 (2), 104–108.
- Bartolomucci, A., Cabassi, A., et al., 2009. Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. *PLoS ONE* 4 (1), e4331.
- Baydyuk, M., Xu, B., 2014. BDNF signaling and survival of striatal neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 254.
- Beckers, S., Peeters, A., et al., 2008. Association of the BDNF Val66Met variation with obesity in women. *Mol. Genet. Metab.* 95 (1–2), 110–112.
- Benoit, S.C., Davis, J.F., et al., 2010. Learned and cognitive controls of food intake. *Brain Res.* 1350, 71–76.
- Berthoud, H.R., Lenard, N.R., et al., 2011. Food reward, hyperphagia, and obesity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300 (6), R1266–R1277.
- Bi, S., Kim, Y.J., et al., 2012. Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides* 46 (6), 309–314.
- Briones, A., Gagno, S., et al., 2012. Stress-induced anhedonia is associated with an increase in Alzheimer's disease-related markers. *Br. J. Pharmacol.* 165 (4), 897–907.
- Burns, B., Schmidt, K., et al., 2010. *Rai1* haploinsufficiency causes reduced Bdnf expression resulting in hyperphagia, obesity and altered fat distribution in mice and humans with no evidence of metabolic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 19 (20), 4026–4042.
- Calabrese, F., Molteni, R., et al., 2009. Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* 34 (Suppl. 1), S208–S216.
- Campbell, S., MacQueen, G., 2004. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J. Psychiatry Neurosci.* 29 (6), 417–426.
- Choquet, H., Meyre, D., 2011. Molecular basis of obesity: current status and future prospects. *Curr. Genomics* 12 (3), 154–168.
- de Oliveira, C., V., Scarabelot, L., et al., 2014. Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptin and triglycerides. *Peptides* 51, 46–53.
- Dallman, M.F., Pecoraro, N., et al., 2003. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (20), 11696–11701.
- Delinsky, S.S., Wilson, G.T., 2008. Weight gain, dietary restraint, and disordered eating in the freshman year of college. *Eat. Behav.* 9 (1), 82–90.
- Der-Avakian, A., Markou, A., 2012. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci.* 35 (1), 68–77.
- Duman, R.S., Monteggia, L.M., 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry* 59 (12), 1116–1127.
- Duman, R.S., Heninger, G.R., et al., 1997. A molecular and cellular theory of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 54 (7), 597–606.
- Duman, R.S., Malberg, J., et al., 1999. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol. Psychiatry* 46 (9), 1181–1191.
- Ely, D.R., Dapper, V., et al., 1997. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol. Behav.* 61 (3), 395–398.
- Estadella, D., Oyama, L.M., et al., 2004. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 20 (2), 218–224.
- Flegal, K.M., Carroll, M.D., et al., 2012. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999–2010. *JAMA* 307 (5), 491–497.
- García-Iglesias, B.B., Mendoza-Garrido, M.E., et al., 2013. Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: involvement of 5-HT(7) receptors. *Neuropharmacology* 71, 216–227.
- Gibson, E.L., 2006. Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways. *Physiol. Behav.* 89 (1), 53–61.
- Hillebrand, J.J., de Wied, D., et al., 2002. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23 (12), 2283–2306.
- Hohn, A., Leibrock, J., et al., 1990. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344 (6264), 339–341.
- Hoshaw, B.A., Malberg, J.E., et al., 2005. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. *Brain Res.* 1037 (1–2), 204–208.
- Jastreboff, A.M., Potenza, M.N., et al., 2011. Body mass index, metabolic factors, and striatal activation during stressful and neutral-relaxing states: an fMRI study. *Neuropsychopharmacology* 36 (3), 627–637.
- Jequier, E., 2002. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967, 379–388.
- Kenny, P.J., 2011. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron* 69 (4), 664–679.
- Koenigs, M., Grafman, J., 2009. Posttraumatic stress disorder: the role of medial prefrontal cortex and amygdala. *Neuroscientist* 15 (5), 540–548.
- Kormos, V., Gaszner, B., 2013. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides* 47 (6), 401–419.
- Kumar, S., Alagawadi, K.R., et al., 2011. Effect of *Argyria speciosa* root extract on cafeteria diet-induced obesity in rats. *Indian J. Pharmacol.* 43 (2), 163–167.
- Larsen, M.H., Hay-Schmidt, A., et al., 2008. Temporal expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in the rat hippocampus after treatment with selective and mixed monoaminergic antidepressants. *Eur. J. Pharmacol.* 578 (2–3), 114–122.
- Leibrock, J., Lottspeich, F., et al., 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341 (6238), 149–152.
- Lenard, N.R., Berthoud, H.R., 2008. Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity (Silver Spring)* 16 (Suppl. 3), S11–S22.
- Lucas, G., V., Rymar, V., et al., 2007. Serotonin(4) (5-HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron* 55 (5), 712–725.
- Macedo, L.C., Medeiros, L.F., et al., 2012. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides* 38 (1), 189–196.
- Malberg, J.E., Schechter, L.E., 2005. Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs. *Curr. Pharm. Des.* 11 (2), 145–155.
- McEwen, B.S., 2008. Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur. J. Pharmacol.* 583 (2–3), 174–185.
- Moreau, J.L., Bourson, A., et al., 1994. Curative effects of the atypical antidepressant mianserin in the chronic mild stress-induced anhedonia model of depression. *J. Psychiatry Neurosci.* 19 (1), 51–56.
- Nyuyki, K.D., Beiderbeck, D.I., et al., 2012. Chronic subordinate colony housing (CSC) as a model of chronic psychosocial stress in male rats. *PLoS ONE* 7 (12), e52371.
- Pascual-Brazo, J., Castro, E., et al., 2012. Modulation of neuroplasticity pathways and antidepressant-like behavioural responses following the short-term (3 and 7 days) administration of the 5-HT(4) receptor agonist RS67333. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15 (5), 631–643.
- Pasquali, R., 2012. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sex hormones in chronic stress and obesity: pathophysiological and clinical aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1264, 20–35.
- Patterson, Z.R., Khazall, R., et al., 2013. Central ghrelin signaling mediates the metabolic response of C57BL/6 male mice to chronic social defeat stress. *Endocrinology* 154 (3), 1080–1091.
- Pecoraro, N., Reyes, F., et al., 2004. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145 (8), 3754–3762.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., et al., 1995. Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Exp. Neurol.* 131 (2), 229–238.
- Pilar-Cuellar, F., Vidal, R., et al., 2013. Neural plasticity and proliferation in the generation of antidepressant effects: hippocampal implication. *Neural Plast.* 2013, 537265.
- Pruunsild, P., Kazantseva, A., et al., 2007. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90 (3), 397–406.
- Rios, M., 2013. BDNF and the central control of feeding: accidental bystander or essential player? *Trends Neurosci.* 36 (2), 83–90.
- Rosas-Vargas, H., Martinez-Ezquerro, J.D., et al., 2011. Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. *Arch. Med. Res.* 42 (6), 482–494.

- Rothman, S.M., Mattson, M.P., 2013. Activity-dependent, stress-responsive BDNF signaling and the quest for optimal brain health and resilience throughout the lifespan. *Neuroscience* 239, 228–240.
- Rothman, S.M., Griffioen, K.J., et al., 2012. Brain-derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1264, 49–63.
- Schmidt, H.D., Duman, R.S., 2010. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. *Neuropsychopharmacology* 35 (12), 2378–2391.
- Shirayama, Y., Chen, A.C., et al., 2002. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J. Neurosci.* 22 (8), 3251–3261.
- Singh, M., 2014. Mood, food, and obesity. *Front. Psychol.* 5, 925.
- Siuciak, J.A., Lewis, D.R., et al., 1997. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56 (1), 131–137.
- Strekalova, T., Spanagel, R., et al., 2004. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology* 29 (11), 2007–2017.
- Strekalova, T., Couch, Y., et al., 2011. Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters. *Behav. Brain Funct.* 7, 9.
- Suzuki, K., Jayasena, C.N., et al., 2012. Obesity and appetite control. *Exp. Diabetes Res.* 2012, 824305.
- Tamburella, A., Micale, V., et al., 2009. Antidepressant properties of the 5-HT4 receptor partial agonist, SL65.0155: behavioral and neurochemical studies in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33 (7), 1205–1210.
- Treadway, M.T., Zald, D.H., 2011. Reconsidering anhedonia in depression: lessons from translational neuroscience. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35 (3), 537–555.
- Tryon, M.S., Carter, C.S., et al., 2013. Chronic stress exposure may affect the brain's response to high calorie food cues and predispose to obesogenic eating habits. *Physiol. Behav.* 120, 233–242.
- van Heesch, F., Prins, J., et al., 2013. Lipopolysaccharide-induced anhedonia is abolished in male serotonin transporter knockout rats: an intracranial self-stimulation study. *Brain Behav. Immun.* 29, 98–103.
- Vogelzangs, N., Kritchevsky, S.B., et al., 2010. Obesity and onset of significant depressive symptoms: results from a prospective community-based cohort study of older men and women. *J. Clin. Psychiatry* 71 (4), 391–399.
- Wang, J.H., Wang, F., et al., 2008. Leptin regulated calcium channels of neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons by activation of different signal pathways. *Neuroscience* 156 (1), 89–98.
- Willner, P., Towell, A., et al., 1987. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93 (3), 358–364.
- Witkin, J.M., Marek, G.J., et al., 2007. Metabotropic glutamate receptors in the control of mood disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 6 (2), 87–100.
- Woods, S.C., D'Alessio, D.A., 2008. Central control of body weight and appetite. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (11 Suppl. 1), S37–S50.
- Ye, Y., Wang, G., et al., 2011. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression. *Neurosci. Lett.* 503 (1), 15–19.
- Zaben, M.J., Gray, W.P., 2013. Neuropeptides and hippocampal neurogenesis. *Neuropeptides* 47 (6), 431–438.
- Zakrzewska, K.E., Cusin, I., et al., 1997. Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance. *Diabetes* 46 (4), 717–719.

8 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta tese demonstram que a dieta de cafeteria mostrou-se um modelo eficaz de obtenção de obesidade, que pode ser reproduzido com sucesso e que mimetiza um padrão ocidental de alimentação (*Western style diet*) composto por dietas altamente palatáveis que contribuem para o desenvolvimento de hiperfagia e alterações na homeostase energética. Um importante achado foi a demonstração de que este modelo altera níveis centrais de BDNF em importantes estruturas do SNC (hipocampo e hipotálamo) relacionadas ao comportamento alimentar e ao comportamento do tipo depressivo. Por outro lado o modelo de estresse crônico por restrição empregado nesta tese que simula o estresse cotidiano induziu importantes alterações neuroquímicas no hipocampo que podem estar relacionadas ao comportamento do tipo depressivo observado nos animais.

O modelo de estresse crônico repetido por restrição (Ely, Dapper et al. 1997) empregado nesta tese vem sendo utilizado por nosso grupo de pesquisa e induz um estresse moderado que gera processos adaptativos tanto em níveis comportamentais quanto bioquímicos (Torres, Gamaro et al. 2001; Torres, Gamaro et al. 2002; Macedo, Medeiros et al. 2012; Spezia Adachi, Caumo et al. 2012; de Oliveira, Scarabelot et al. 2014). O modelo de dieta de cafeteria utilizado em ambos os protocolos experimentais foi elaborado com alimentos de consumo humano altamente palatáveis e já empregado em estudos prévios de nosso grupo (Macedo, Medeiros et al. 2012; de Oliveira, Scarabelot et al. 2014). É importante salientar que a exposição por 40 dias (6 semanas) à dieta de cafeteria demonstrou um efeito significativo no aumento do tecido adiposo, denotando obesidade e desencadeando hipertrigliceridemia e hiperleptinemia (Macedo, Medeiros et al. 2012). Já uma exposição por 80 dias (12 semanas) à dieta de cafeteria associada ao modelo de estresse crônico por restrição, mesmo modelo empregado no segundo protocolo experimental desta tese, desencadeou um severo aumento nos depósitos de tecido adiposo visceral, mesentérico e subcutâneo (Macedo, Rozisky et al. 2014), intensa hiperleptinemia e também dessincronização do padrão temporal de leptina (de Oliveira, Scarabelot et al. 2014) corroborando estudos anteriores (Dardeno, Chou et al. 2010).

Os dados obtidos no primeiro protocolo experimental demonstram que 6 semanas de exposição à dieta de cafeteria desencadeia obesidade, diminuição dos níveis de BDNF e maior susceptibilidade ao dano celular no hipocampo. Além disto, os animais alimentados com dieta de

cafeteria tornaram-se hiperfágicos, sugerindo um típico comportamento de compulsão alimentar desencadeado pelo alimento hipercalórico altamente palatável. Observou-se também significativa maior atividade exploratória e locomotora nos animais obesos.

O hipocampo tem sido classicamente associado a mecanismos de aprendizagem e memória. Estudos sugerem que o papel do BDNF nesta estrutura é atuar como mediador no processo de potenciação de longa duração (LTP do inglês, *Long-term potentiation*), identificado como o principal substrato celular para aprendizagem e memória (Poncer 2003; Leal, Afonso et al. 2014). Já o hipotálamo é uma estrutura cerebral classicamente envolvida com o controle alimentar (Rios 2011). Nesta estrutura, o BDNF e seu receptor TrkB participam da modulação de neurônios orexígenos e anorexígenos (Rothman, Griffioen et al. 2012; Rios 2013), que são estratégicos no controle do balanço energético (Rios 2011; Rios 2014) e do peso corporal (Wang, Godar et al. 2010). Modelo experimental de lesão ao hipotálamo ventromedial, núcleo onde o BDNF é altamente expresso (Kernie, Liebl et al. 2000), desencadeia uma síndrome de hiperfagia e obesidade semelhante à observada em ratinhos deficientes em leptina (Yu, Wang et al. 2009), enquanto estudos com humanos demonstram que polimorfismos genéticos na expressão BDNF (Beckers, Peeters et al. 2008; Burns, Schmidt et al. 2010) ou mutações do gene que codifica seu receptor TrkB (Yeo, Connie Hung et al. 2004) têm sido associados a alterações no consumo alimentar e no desenvolvimento da obesidade (Wang, Godar et al. 2010). Interações BDNF-leptina podem levar à supressão do apetite, porque a leptina induz a tradução local de BDNF mRNA em dendritos dos neurônios do hipotálamicos (Liao, An et al. 2012).

Apesar do clássico papel do hipotálamo em orquestrar o controle alimentar, sabe-se que outras estruturas encefálicas estão envolvidas neste complexo processo. O hipocampo, por exemplo, contém receptores ativados por hormônios liberados na periferia, como a grelina (estômago) e a leptina (tecido adiposo), sugerindo que esta estrutura participe ativamente do controle alimentar. Estudos demonstram uma intensa comunicação entre os neurônios hipocampais e regiões hipotálamicas densas em neurônios orexígenos e anorexígenos, como o núcleo arqueado do hipotálamo. Além disto, o hipocampo recebe informações relacionadas com a alimentação vinda do núcleo do trato solitário, da ínsula e do córtex pré-frontal (Lathe 2001; Cenquizca and Swanson 2007; Lenard and Berthoud 2008; Rolls 2008).

Outro aspecto relevante desta tese é que, além da diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo, observamos também o aumento nos níveis de LDH, um marcador de dano tecidual em presença de H₂O₂. É importante salientar que o tecido hipocampal dos animais obesos mostrou uma maior liberação de LDH mesmo na ausência de exposição de H₂O₂, sugerindo que a obesidade isoladamente induz danos à membrana celular, favorecendo morte celular e podendo comprometer de forma importante a integridade desta estrutura. Este resultado pode estar associado ao aumento do estresse oxidativo observado na obesidade, que pode ocasionar dano a proteínas e lipídios (Furukawa, Fujita et al. 2004; Fridlyand and Philipson 2006; Ruperez, Gil et al. 2014; Sinha, Ghosh et al. 2014).

O aumento das atividades exploratória e locomotora observadas neste protocolo experimental entre os animais obesos pode estar relacionado ao aumento dos níveis de leptina. Estudos prévios demonstram que este hormônio aumenta a atividade exploratória e locomotora e a sensibilidade a alimentos altamente palatáveis (Murray, Tulloch et al. 2014). Wang e colaboradores mostraram que animais *knockout* para o receptor de leptina apresentam redução na atividade locomotora (Wang, Kasting et al. 2014). Não podemos descartar também que o dano ao tecido hipocampal possa estar influenciando o aumento na atividade locomotora, considerando a hipótese de que neurônios hipocampais produzem uma memória da refeição (memória episódica) que auxilia a determinar o intervalo entre cada refeição. O dano à memória episódica pode levar à perda da capacidade de discriminar o estado de saciedade, diminuindo o intervalo entre as refeições e, com isso, o consumo alimentar (Pais, Zietek et al. 2014). Considerando a importância da integridade do hipocampo no processo de memória, sugerimos que o somatório entre a diminuição dos níveis de BDNF e o aumento de dano celular ao hipocampo em animais obesos poderia estar comprometendo a memória episódica destes animais, contribuindo com a hiperfagia observada neste estudo. Além disto, podemos sugerir que haja uma diminuição no intervalo entre as refeições que pode ser a causa ou a consequência do aumento na atividade locomotora. Os resultados do primeiro protocolo experimental em conjunto sugerem que o dano ao hipocampo pode ser um importante fator no desencadeamento de alterações no comportamento alimentar de animais obesos.

O segundo protocolo experimental demonstra a associação entre um modelo de obesidade (dieta cafeteria/hipercalórica) e um protocolo de estresse crônico por restrição por um período de 12 semanas. Verificou-se que os ratos que receberam a dieta de cafeteria sem exposição ao estresse

crônico associado apresentaram aumento na ingestão calórica, tornando-se obesos. Este é um resultado previsível, uma vez que mostramos no primeiro protocolo experimental que apenas 6 semanas de exposição à dieta de cafeteria desencadeia um robusto padrão de obesidade. Além disto, a obesidade induziu uma diminuição nos níveis de BDNF no hipotálamo e uma interação entre o estresse crônico e a dieta hipercalórica no sentido de diminuir seus níveis hipocampais. Por outro lado, o estresse crônico diminuiu o consumo de sacarose no teste da anedonia.

O efeito do estresse crônico sobre os níveis de BDNF no hipocampo pode estar associado à diminuição no consumo de sacarose na presença do estresse, caracterizando um comportamento anedônico nos animais submetidos ao estresse. Estes resultados corroboram a hipótese da neuroplasticidade da depressão baseada na diminuição dos níveis de BDNF (Malberg and Schechter 2005; Duman and Monteggia 2006). Modelos experimentais com infusão de BDNF no cérebro (Siuciak, Lewis et al. 1997; Hoshaw, Malberg et al. 2005), mais especificamente no hipocampo (Shirayama, Chen et al. 2002; Ye, Wang et al. 2011), ou periféricamente (Schmidt and Duman 2010), produzem efeitos do tipo antidepressivo. Estudos farmacológicos demonstram que alguns antidepressivos podem regular os níveis de BDNF hipocampal, após tratamento agudo (1, 5 e 24 horas), sub crônico (7 dias) ou crônico, por meio da ativação dos receptores 5-HT₄ para serotonina (Duman and Monteggia 2006; Lucas, Rymar et al. 2007; Larsen, Hay-Schmidt et al. 2008; Tamburella, Micale et al. 2009; Zaben and Gray 2013). Aumento nos níveis de BDNF e da expressão de seu RNAm no hipocampo (Tamburella, Micale et al. 2009; Pascual-Brazo, Castro et al. 2012) também induzem efeitos antidepressivos (Duman, Heninger et al. 1997; Duman, Malberg et al. 1999; Calabrese, Molteni et al. 2009). No entanto, os níveis de BDNF em resposta ao estresse e aos antidepressivos são fármaco e região-específicos (Duman and Monteggia 2006).

Nossos resultados corroboram estudos anteriores que demonstram que o estresse induz anedonia. A anedonia caracteriza-se pela incapacidade em experimentar prazer e é provavelmente causada por uma alteração no sistema de recompensa (van Heesch, Prins et al. 2013) e constitui um comportamento/sintoma característico de depressão e pode ser desencadeada pela exposição ao estresse crônico (Macdiarmid, Cade et al. 1996; Strekalova, Spanagel et al. 2004; Briones, Gagno et al. 2012). É importante salientar que modelos de estresse crônico têm uma maior relevância etiológica e validade externa em mimetizar depressão, sendo um dos paradigmas pré-clínicos mais largamente utilizados para avaliação deste transtorno (Strekalova, Couch et al. 2011). Conforme

utilizado neste estudo, o consumo de sacarose é um teste amplamente aplicado para avaliar o comportamento do tipo depressivo em animais de experimentação capaz de identificar o comportamento anedônico (Willner, Towell et al. 1987).

Vários mecanismos biológicos têm sido associados aos comportamentos do tipo depressivo, entre eles alterações em níveis de BDNF hipocampal promovendo alterações nos processos de neurogênese e de plasticidade deste tecido (Autry and Monteggia 2012). Estudos em animais e humanos indicam que modificações em estruturas cerebrais estão envolvidas nestes processos (Koenigs and Grafman 2009). O córtex frontal e o hipocampo, por exemplo, podem apresentar perda de volume na depressão maior (Campbell and Macqueen 2004). Somado a isto, danos ao hipocampo podem prejudicar a regulação do peso corporal e da homeostase energética, induzindo obesidade devido à redução na neuroplasticidade e na função hipocampal (Benoit, Davis et al. 2010). É importante salientar que a depressão maior está relacionada a outros sistemas de neurotransmissores que atuam na regulação do humor, ansiedade, medo, processamento de recompensa, atenção, motivação, respostas ao estresse, interação social e função neurovegetativa (Pilar-Cuellar, Vidal et al. 2013). Adicionalmente, alterações na neurotransmissão glutamatérgica cortical têm sido associadas ao estado depressivo (Witkin, Marek et al. 2007).

O estresse pode ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e desencadear estimulação na produção e liberação de corticosterona (Herman, Figueiredo et al. 2003). Em estudos prévios do grupo, demonstramos que 6 semanas de exposição ao estresse crônico por restrição não alteram os níveis de corticosterona, sugerindo adaptação do eixo HHA (Macedo, Medeiros et al. 2012). No entanto, após 12 semanas de tratamento, um protocolo similar ao utilizado no segundo protocolo experimental desta tese, que avaliou os níveis de corticosterona em três diferentes horários (1h, 7h e 19h) demonstrou que às 19h os níveis de corticosterona nos animais estressados apresentaram-se aumentados. Este resultado sugere que o padrão pulsátil de liberação de corticosterona apresenta uma perda do processo de adaptação do eixo HHA neste horário (de Oliveira, Scarabelot et al. 2014). Cabe salientar também que os animais submetidos ao estresse apresentaram um significativo aumento do peso relativo da glândula adrenal, demonstrando hipertrofia nesta estrutura. O estresse crônico pode levar ao aumento do tamanho da glândula adrenal (Garcia-Iglesias, Mendoza-Garrido et al. 2013) sendo este um achado clássico das alterações desencadeadas pelo estresse crônico (Selye 1976).

Nosso estudo mostra que a dieta de cafeteria aumenta a ingestão calórica ao longo do tempo, efeito este modulado pelo estresse crônico que impede tal aumento. Resultados acerca da ingestão de alimentos e situações de exposição ao estresse são contraditórios, uma vez que o estresse pode ocasionar aumento ou diminuição da ingestão de alimentos, dependendo do tipo de estressor. O estresse crônico, por exemplo, pode aumentar o consumo de alimentos altamente palatáveis, desencadeando obesidade, ou ainda diminuir o apetite, resultando em perda de peso (Singh 2014). Um dos mecanismos propostos para alterações no comportamento alimentar frente ao estresse é atribuído à liberação de glicocorticoides aumentando a resistência central à leptina e impedindo a adequada sinalização deste hormônio no controle alimentar (Zakrzewska, Cusin et al. 1997; Jequier 2000). Em contrapartida, estudos com humanos e animais mostram que a ingestão de alimentos saborosos pode reduzir sinais de estresse e ansiedade, sugerindo uma via neurobiológica comum ao estresse e ao comportamento alimentar comum (Singh 2014).

Por outro lado, a obesidade também aumenta o risco de sintomas depressivos em humanos. Doenças relacionadas à obesidade abdominal, tais como diabetes e coronariopatias, também têm sido associadas com depressão. Estas doenças dependem de propriedades específicas da gordura visceral (Vogelzangs, Kritchevsky et al. 2010) e possivelmente resultam de uma resposta inadequada do eixo HHA ao estresse repetido (Pasquali 2012).

Os achados desta tese em ambos os protocolos experimentais, empregando modelo de obesidade associado ou não ao modelo de estresse crônico por restrição, corroboram e ampliam nossos achados anteriores e permitem sugerir que estes modelos desencadeiam importantes alterações neuroendócrinas e comportamentais. Salientamos que os efeitos exercidos por estes dois importantes fatores de doença na neuroplasticidade e em padrões comportamentais possam contribuir para o entendimento das bases biológicas das comorbidades a eles associados. Porém são necessários mais estudos que possam auxiliar na elucidação dos mecanismos biológicos envolvidos na modulação da sinalização do controle alimentar e da depressão pelo BDNF na presença de obesidade e estresse. Não podemos descartar que esta neurotrofina, devido à sua larga distribuição no SNC tenha um importante papel em outras importantes vias de sinalização central envolvidas com comportamento alimentar como o sistema de recompensa.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta tese, levando em consideração os dois modelos experimentais aplicados, nos permitem concluir que:

- A dieta de cafeteria desencadeou hiperfagia e mostrou-se um modelo eficaz de obtenção de obesidade.
- A obesidade induziu diminuição nos níveis hipocampais de BDNF e maior susceptibilidade ao dano celular evidenciado pelo aumento da liberação de LDH neste tecido.
- A hiperfagia apresentada pode ser o resultado da perda da integridade celular hipocampal sugerindo alterações na memória episódica que auxilia a determinar o intervalo entre as refeições.
- Animais obesos apresentaram um aumento na atividade exploratória e locomotora que pode ter contribuído com a hiperfagia por reduzir o tempo de intervalo entre as refeições.
- Neste estudo o estresse crônico impediu o aumento do consumo calórico, mas o efeito do estresse sobre o consumo alimentar pode variar de acordo com diferentes paradigmas de estresse.
- A obesidade induziu diminuição nos níveis hipotalâmicos de BDNF.
- O estresse crônico e a obesidade exerceram efeitos deletérios sobre o hipocampo acarretando a diminuição nos níveis de BDNF.

De uma forma geral, é possível concluir neste estudo que alimentos altamente palatáveis como os presentes na dieta de cafeteria são atrativos e induzem aumento do consumo calórico desencadeando obesidade. A obesidade, por sua vez, associada ou não e ao estresse crônico pode desencadear importantes alterações nos níveis teciduais de BDNF no hipocampo ou hipotálamo resultando em alterações comportamentais relacionadas ao humor (anedonia) ou ao comportamento alimentar (hiperfagia).

PERSPECTIVAS

O corpo de resultados que compõe esta tese nos instiga a dar continuidade aos estudos com obesidade e estresse crônico, buscando um maior entendimento das bases biológicas associadas a

estes fatores. Com base nisto relacionamos abaixo objetivos a serem abordados em estudos futuros envolvendo modelo de obesidade associado ao estresse crônico.

- Investigar o efeito da exposição crônica e a abstinência ao alimento altamente palatável sobre parâmetros comportamentais e moleculares.

- Avaliar o envolvimento do sistema de recompensa no comportamento alimentar envolvendo a sinalização dopaminérgica, serotoninérgica e opiodérgica.

- Avaliar a densidade do receptor pré-sináptico de dopamina (D2).

- Correlacionar os níveis de dopamina, leptina e a densidade do receptor pré-sináptico de dopamina (D2).

Referências

- Adam, T. C. and E. S. Epel (2007). "Stress, eating and the reward system." *Physiol Behav* 91(4): 449-458.
- Ahima, R. S. (2006). "Adipose tissue as an endocrine organ." *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5: 242S-249S.
- Almli, L. M., S. E. Hamrick, et al. (2001). "Multiple pathways of neuroprotection against oxidative stress and excitotoxic injury in immature primary hippocampal neurons." *Brain Res Dev Brain Res* 132(2): 121-129.
- Autry, A. E. and L. M. Monteggia (2012). "Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders." *Pharmacol Rev* 64(2): 238-258.
- Banasr, M. and R. S. Duman (2007). "Regulation of neurogenesis and gliogenesis by stress and antidepressant treatment." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6(5): 311-320.
- Bear Mark F. *Neurosciência: desvendando o sistema nervoso* Mark F. Bear, Barry W. Connors, Michael A. Paradiso; tradução Carla Dalmaz [et al.]. – 3. Ed. – Porto Alegre: Artmed, 2008. 896 p.
- Beckers, S., A. Peeters, et al. (2008). "Association of the BDNF Val66Met variation with obesity in women." *Mol Genet Metab* 95(1-2): 110-112.
- Benoit, S. C., J. F. Davis, et al. (2010). "Learned and cognitive controls of food intake." *Brain Res* 1350: 71-76.
- Berton, O. and E. J. Nestler (2006). "New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines." *Nat Rev Neurosci* 7(2): 137-151.
- Bessesen, D. H. (2011). "Regulation of body weight: what is the regulated parameter?" *Physiol Behav* 104(4): 599-607.
- Bickler, P. E. and C. S. Fahlman (2006). "The inhaled anesthetic, isoflurane, enhances Ca²⁺-dependent survival signaling in cortical neurons and modulates MAP kinases, apoptosis proteins and transcription factors during hypoxia." *Anesth Analg* 103(2): 419-429, table of contents.
- Blugeot, A., C. Rivat, et al. (2011). "Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers." *J Neurosci* 31(36): 12889-12899.
- Blundell, J. E., C. L. Lawton, et al. (1996). "Control of human appetite: implications for the intake of dietary fat." *Annu Rev Nutr* 16: 285-319.
- Blundell, J. E., C. L. Lawton, et al. (1995). "Serotonin, eating behavior, and fat intake." *Obes Res* 3 Suppl 4: 471S-476S.
- Bohm, A., A. M. Ordheide, et al. (2012). "Common genetic variation in the SERPINF1 locus determines overall adiposity, obesity-related insulin resistance, and circulating leptin levels." *PLoS One* 7(3): e34035.
- Bouret, S. G. (2010). "Role of early hormonal and nutritional experiences in shaping feeding behavior and hypothalamic development." *J Nutr* 140(3): 653-657.
- Bramham, C. R. and E. Messaoudi (2005). "BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis." *Prog Neurobiol* 76(2): 99-125.

- Briones, A., S. Gagno, et al. (2012). "Stress-induced anhedonia is associated with an increase in Alzheimer's disease-related markers." *Br J Pharmacol* 165(4): 897-907.
- Broberger, C. (2005). "Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks." *J Intern Med* 258(4): 301-327.
- Burns, B., K. Schmidt, et al. (2010). "Rai1 haploinsufficiency causes reduced Bdnf expression resulting in hyperphagia, obesity and altered fat distribution in mice and humans with no evidence of metabolic syndrome." *Hum Mol Genet* 19(20): 4026-4042.
- Calabrese, F., R. Molteni, et al. (2009). "Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders." *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1: S208-216.
- Campbell, S. and G. Macqueen (2004). "The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression." *J Psychiatry Neurosci* 29(6): 417-426.
- Cartwright, M., J. Wardle, et al. (2003). "Stress and dietary practices in adolescents." *Health Psychol* 22(4): 362-369.
- Cenquizca, L. A. and L. W. Swanson (2006). "Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat." *J Comp Neurol* 497(1): 101-114.
- Cenquizca, L. A. and L. W. Swanson (2007). "Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex." *Brain Res Rev* 56(1): 1-26.
- Chrousos, G. P. (2009). "Stress and disorders of the stress system." *Nat Rev Endocrinol* 5(7): 374-381.
- Contoreggi, C. (2015). "Corticotropin releasing hormone and imaging, rethinking the stress axis." *Nucl Med Biol* 42(4): 323-339.
- Cook, T., Rutishauser, I., et al. (2001). *Comparable Measurements from the 1983,1985 and 1995 National Nutrition Surveys*. Australian Food and Nutrition Monitoring Unit, Canberra.
- Cowley, M. A., J. L. Smart, et al. (2001). "Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus." *Nature* 411(6836): 480-484.
- Cunha, C., R. Brambilla, et al. (2010). "A simple role for BDNF in learning and memory?" *Front Mol Neurosci* 3: 1.
- Dallman, M. F. (2010). "Stress-induced obesity and the emotional nervous system." *Trends Endocrinol Metab* 21(3): 159-165.
- Damiani D, Daniel Damiani, et al. (2010). *Appetite control: metabolic and cognitive mechanisms*. *Pediatrics* 32(3):211-22
- Dardeno, T. A., S. H. Chou, et al. (2010). "Leptin in human physiology and therapeutics." *Front Neuroendocrinol* 31(3): 377-393.
- de Oliveira, C., V. L. Scarabelot, et al. (2014). "Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptin and triglycerides." *Peptides* 51: 46-53.
- de Wit, L., F. Luppino, et al. (2010). "Depression and obesity: a meta-analysis of community-based studies." *Psychiatry Res* 178(2): 230-235.
- Der-Avakian, A. and A. Markou (2012). "The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits." *Trends Neurosci* 35(1): 68-77.

- Despres, J. P., I. Lemieux, et al. (2008). "Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(6): 1039-1049.
- Drewnowski, A. (2000). "Nutrition transition and global dietary trends." *Nutrition* 16(7-8): 486-487.
- Drewnowski, A. and M. R. Greenwood (1983). "Cream and sugar: human preferences for high-fat foods." *Physiol Behav* 30(4): 629-633.
- Duman, R. S. (2014). "Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections." *Depress Anxiety* 31(4): 291-296.
- Duman, R. S., G. R. Heninger, et al. (1997). "A molecular and cellular theory of depression." *Arch Gen Psychiatry* 54(7): 597-606.
- Duman, R. S., J. Malberg, et al. (1999). "Neural plasticity to stress and antidepressant treatment." *Biol Psychiatry* 46(9): 1181-1191.
- Duman, R. S. and L. M. Monteggia (2006). "A neurotrophic model for stress-related mood disorders." *Biol Psychiatry* 59(12): 1116-1127.
- Duman, R. S. and B. Voleti (2012). "Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents." *Trends Neurosci* 35(1): 47-56.
- Ely, D. R., V. Dapper, et al. (1997). "Effect of restraint stress on feeding behavior of rats." *Physiol Behav* 61(3): 395-398.
- Erlanson-Albertsson, C. (2005). "How palatable food disrupts appetite regulation." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97(2): 61-73.
- Estadella, D., L. M. Oyama, et al. (2004). "Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats." *Nutrition* 20(2): 218-224.
- Fridlyand, L. E. and L. H. Philipson (2006). "Reactive species, cellular repair and risk factors in the onset of type 2 diabetes mellitus: review and hypothesis." *Curr Diabetes Rev* 2(2): 241-259.
- Furukawa, S., T. Fujita, et al. (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." *J Clin Invest* 114(12): 1752-1761.
- Garcia-Iglesias, B. B., M. E. Mendoza-Garrido, et al. (2013). "Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: involvement of 5-HT(7) receptors." *Neuropharmacology* 71: 216-227.
- Gibson, E. L. (2006). "Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways." *Physiol Behav* 89(1): 53-61.
- Gobinath, A. R., R. Mahmoud, et al. (2014). "Influence of sex and stress exposure across the lifespan on endophenotypes of depression: focus on behavior, glucocorticoids, and hippocampus." *Front Neurosci* 8: 420.
- Goldstone, A. P. (2006). "The hypothalamus, hormones, and hunger: alterations in human obesity and illness." *Prog Brain Res* 153: 57-73.
- Hebebrand, J., A. Hinney, et al. (2013). "Molecular genetic aspects of weight regulation." *Dtsch Arztebl Int* 110(19): 338-344.
- Herman, J. P., H. Figueiredo, et al. (2003). "Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness." *Front Neuroendocrinol* 24(3): 151-180.

- Hohn, A., J. Leibrock, et al. (1990). "Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family." *Nature* 344(6264): 339-341.
- Horvath, T. L., S. Diano, et al. (2001). "Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective." *Endocrinology* 142(10): 4163-4169.
- Hoshaw, B. A., J. E. Malberg, et al. (2005). "Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects." *Brain Res* 1037(1-2): 204-208.
- Jastreboff, A. M., M. N. Potenza, et al. (2011). "Body mass index, metabolic factors, and striatal activation during stressful and neutral-relaxing states: an FMRI study." *Neuropsychopharmacology* 36(3): 627-637.
- Jequier, E. (2000). "Obesity management--new perspectives." *Ther Umsch* 57(8): 473-477.
- Jequier, E. (2002). "Leptin signaling, adiposity, and energy balance." *Ann N Y Acad Sci* 967: 379-388.
- Kageyama, H., F. Takenoya, et al. (2010). "Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding." *Neuropeptides* 44(2): 133-138.
- Kalra, S. P., M. G. Dube, et al. (1999). "Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight." *Endocr Rev* 20(1): 68-100.
- Kanoski, S. E. and T. L. Davidson (2011). "Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity." *Physiol Behav* 103(1): 59-68.
- Keller, L., W. Xu, et al. (2011). "The obesity related gene, FTO, interacts with APOE, and is associated with Alzheimer's disease risk: a prospective cohort study." *J Alzheimers Dis* 23(3): 461-469.
- Kenny, P. J. (2011). "Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction." *Nat Rev Neurosci* 12(11): 638-651.
- Kernie, S. G., D. J. Liebl, et al. (2000). "BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice." *EMBO J* 19(6): 1290-1300.
- Kim, J. J., E. Y. Song, et al. (2006). "Stress effects in the hippocampus: synaptic plasticity and memory." *Stress* 9(1): 1-11.
- Koenigs, M. and J. Grafman (2009). "Posttraumatic stress disorder: the role of medial prefrontal cortex and amygdala." *Neuroscientist* 15(5): 540-548.
- Koh, J. Y. and D. W. Choi (1987). "Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay." *J Neurosci Methods* 20(1): 83-90.
- Larsen, M. H., A. Hay-Schmidt, et al. (2008). "Temporal expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in the rat hippocampus after treatment with selective and mixed monoaminergic antidepressants." *Eur J Pharmacol* 578(2-3): 114-122.
- Lathe, R. (2001). "Hormones and the hippocampus." *J Endocrinol* 169(2): 205-231.
- Lawton, C. L., J. K. Wales, et al. (1995). "Serotonergic manipulation, meal-induced satiety and eating pattern: effect of fluoxetine in obese female subjects." *Obes Res* 3(4): 345-356.
- Leal, G., P. M. Afonso, et al. (2014). "Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF." *Brain Res.*
- Leibrock, J., F. Lottspeich, et al. (1989). "Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor." *Nature* 341(6238): 149-152.

- Lenard, N. R. and H. R. Berthoud (2008). "Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes." *Obesity (Silver Spring)* 16 Suppl 3: S11-22.
- Liao, G. Y., J. J. An, et al. (2012). "Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin." *Nat Med* 18(4): 564-571.
- Lister, R. G. (1987). "The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse." *Psychopharmacology (Berl)* 92(2): 180-185.
- Lu, L. X., J. H. Yon, et al. (2006). "General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain." *Apoptosis* 11(9): 1603-1615.
- Lu, Y., K. Christian, et al. (2008). "BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory?" *Neurobiol Learn Mem* 89(3): 312-323.
- Lucas, G., V. V. Rymar, et al. (2007). "Serotonin(4) (5-HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action." *Neuron* 55(5): 712-725.
- Luppino, F. S., L. M. de Wit, et al. (2010). "Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies." *Arch Gen Psychiatry* 67(3): 220-229.
- Lutter, M. and E. J. Nestler (2009). "Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake." *J Nutr* 139(3): 629-632.
- Macdiarmid, J. I., J. E. Cade, et al. (1996). "High and low fat consumers, their macronutrient intake and body mass index: further analysis of the National Diet and Nutrition Survey of British Adults." *Eur J Clin Nutr* 50(8): 505-512.
- Macedo, I. C., L. F. Medeiros, et al. (2012). "Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels." *Peptides* 38(1): 189-196.
- Macedo, I.C., Rozisky, J. R., et al. (2014). Obesity and Chronic Stress Modulate Adenine Nucleotide Hydrolysis in Rat Blood Serum. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars* 3, p.10 – 16.
- Malberg, J. E. and L. E. Schechter (2005). "Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs." *Curr Pharm Des* 11(2): 145-155.
- McEwen, B. S. (1999). "Stress and hippocampal plasticity." *Annu Rev Neurosci* 22: 105-122.
- McNay, D. E., N. Briancon, et al. (2012). "Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice." *J Clin Invest* 122(1): 142-152.
- Mei, Z., Grummer-Strawn, L.M., et al. (2002). Validity of body mass index compared with other body-composition screening indexes for the assessment of body fatness in children and adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.* 75, 978–985.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2012) VIGITEL BRASIL 2012-VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO.(http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2012_vigilancia_risco.pdf, acesso em 25 de fevereiro de 2015).
- Monteiro, C. A., J. C. Moubarac, et al. (2013). "Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system." *Obes Rev* 14 Suppl 2: 21-28.
- Morton, G. J., D. E. Cummings, et al. (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." *Nature* 443(7109): 289-295.

- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Murray, S., A. Tulloch, et al. (2014). "Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity." *Nat Rev Endocrinol* 10(9): 540-552.
- NBC Nightly News: <http://www.nbcnews.com/nightly-news/infographic-obesity-skyrockets-across-globe-n116996> First published May 28th 2014, 10:15 pm; acesso em 25 de fevereiro de 2015).
- Ng, M., T. Fleming, et al. (2014). "Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." *Lancet* 384(9945): 766-781.
- Nguyen, A. D., H. Herzog, et al. (2011). "Neuropeptide Y and peptide YY: important regulators of energy metabolism." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18(1): 56-60.
- Nogueiras, R., L. M. Williams, et al. (2010). "Ghrelin: new molecular pathways modulating appetite and adiposity." *Obes Facts* 3(5): 285-292.
- Novkovic, T., T. Mittmann, et al. (2015). "BDNF contributes to the facilitation of hippocampal synaptic plasticity and learning enabled by environmental enrichment." *Hippocampus* 25(1): 1-15.
- Oliver, G. and J. Wardle (1999). "Perceived effects of stress on food choice." *Physiol Behav* 66(3): 511-515.
- Pais, R., T. Zietek, et al. (2014). "RANTES (CCL5) reduces glucose-dependent secretion of glucagon-like peptides 1 and 2 and impairs glucose-induced insulin secretion in mice." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307(3): G330-337.
- Park, H. J., S. Lee, et al. (2015). "Glucocorticoid- and long-term stress-induced aberrant synaptic plasticity are mediated by activation of the glucocorticoid receptor." *Arch Pharm Res*.
- Park, H. R. and J. Lee (2011). "Neurogenic contributions made by dietary regulation to hippocampal neurogenesis." *Ann N Y Acad Sci* 1229: 23-28.
- Pascual-Brazo, J., E. Castro, et al. (2012). "Modulation of neuroplasticity pathways and antidepressant-like behavioural responses following the short-term (3 and 7 days) administration of the 5-HT(4) receptor agonist RS67333." *Int J Neuropsychopharmacol* 15(5): 631-643.
- Pasquali, R. (2012). "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sex hormones in chronic stress and obesity: pathophysiological and clinical aspects." *Ann N Y Acad Sci* 1264: 20-35.
- Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, et al. (1995). "Characteristics of BDNF-induced weight loss." *Exp Neurol* 131(2): 229-238.
- Piernas, C. and B. M. Popkin (2011). "Increased portion sizes from energy-dense foods affect total energy intake at eating occasions in US children and adolescents: patterns and trends by age group and sociodemographic characteristics, 1977-2006." *Am J Clin Nutr* 94(5): 1324-1332.
- Pilar-Cuellar, F., R. Vidal, et al. (2013). "Neural plasticity and proliferation in the generation of antidepressant effects: hippocampal implication." *Neural Plast* 2013: 537265.
- Ploeger, G. E., B. M. Spruijt, et al. (1992). "Effects of haloperidol on the acquisition of a spatial learning task." *Physiol Behav* 52(5): 979-983.

- Poncer, J. C. (2003). "Hippocampal long term potentiation: silent synapses and beyond." *J Physiol Paris* 97(4-6): 415-422.
- Popkin, B. M. (2006). "Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases." *Am J Clin Nutr* 84(2): 289-298.
- Rangan, A.M., Randall, D., et al.(2008). Consumption of 'extra' foods by Australian children: types, quantities and contribution to energy and nutrient intakes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 62, 356–364.
- Rangan, A.M., Schindeler, S., et al. (2009). Consumption of 'extra' foods by Australian adults: types, quantities and contribution to energy and nutrient intakes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, 865–871.
- Richardson, A. S., J. Boone-Heinonen, et al. (2011). "Neighborhood fast food restaurants and fast food consumption: a national study." *BMC Public Health* 11: 543.
- Rios, M. (2011). "New insights into the mechanisms underlying the effects of BDNF on eating behavior." *Neuropsychopharmacology* 36(1): 368-369.
- Rios, M. (2013). "BDNF and the central control of feeding: accidental bystander or essential player?" *Trends Neurosci* 36(2): 83-90.
- Rios, M. (2014). "Neurotrophins and the regulation of energy balance and body weight." *Handb Exp Pharmacol* 220: 283-307.
- Rolls, E. T. (2008). "Functions of the orbitofrontal and pregenual cingulate cortex in taste, olfaction, appetite and emotion." *Acta Physiol Hung* 95(2): 131-164.
- Rothman, S. M., K. J. Griffioen, et al. (2012). "Brain-derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health." *Ann N Y Acad Sci* 1264: 49-63.
- Rothman, S. M. and M. P. Mattson (2013). "Activity-dependent, stress-responsive BDNF signaling and the quest for optimal brain health and resilience throughout the lifespan." *Neuroscience* 239: 228-240.
- Ruperez, A. I., A. Gil, et al. (2014). "Genetics of oxidative stress in obesity." *Int J Mol Sci* 15(2): 3118-3144.
- Sahu, A., M. G. Dube, et al. (1995). "Insulin and insulin-like growth factor II suppress neuropeptide Y release from the nerve terminals in the paraventricular nucleus: a putative hypothalamic site for energy homeostasis." *Endocrinology* 136(12): 5718-5724.
- Sainsbury, A., G. J. Cooney, et al. (2002). "Hypothalamic regulation of energy homeostasis." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16(4): 623-637.
- Sampey, B. P., A. M. Vanhoose, et al. (2011). "Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet." *Obesity (Silver Spring)* 19(6): 1109-1117.
- Schmidt, H. D. and R. S. Duman (2010). "Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models." *Neuropsychopharmacology* 35(12): 2378-2391.
- Schoenfeld, T. J. and E. Gould (2012). "Stress, stress hormones, and adult neurogenesis." *Exp Neurol* 233(1): 12-21.
- Schwartz, G. J., A. V. Azzara, et al. (2013). "Roles for central leptin receptors in the control of meal size." *Appetite* 71: 466-469.

- Schwartz, M. W. and R. W. Gelling (2002). "Rats lighten up with MCH antagonist." *Nat Med* 8(8): 779-781.
- Schwartz, M. W. and D. Porte, Jr. (2005). "Diabetes, obesity, and the brain." *Science* 307(5708): 375-379.
- Selye, H. (1976). "The stress concept." *Can Med Assoc J* 115(8): 718.
- Shansky, R. M. and J. H. Morrison (2009). "Stress-induced dendritic remodeling in the medial prefrontal cortex: effects of circuit, hormones and rest." *Brain Res* 1293: 108-113.
- Shirayama, Y., A. C. Chen, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression." *J Neurosci* 22(8): 3251-3261.
- Silveira, P. P., A. K. Portella, et al. (2005). "The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior." *Int J Dev Neurosci* 23(1): 93-99.
- Singh, M. (2014). "Mood, food, and obesity." *Front Psychol* 5: 925.
- Sinha, J. K., S. Ghosh, et al. (2014). "Increased macromolecular damage due to oxidative stress in the neocortex and hippocampus of WNIN/Ob, a novel rat model of premature aging." *Neuroscience* 269: 256-264.
- Siqueira, I. R., V. R. Elsner, et al. (2011). "Ascorbate uptake is decreased in the hippocampus of ageing rats." *Neurochem Int* 58(4): 527-532.
- Siuciak, J. A., D. R. Lewis, et al. (1997). "Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)." *Pharmacol Biochem Behav* 56(1): 131-137.
- Sohn, J. W. (2015). "Network of Hypothalamic Neurons that Control Appetite." *BMB Rep.*
- Sossin, W. S. and P. A. Barker (2007). "Something old, something new: BDNF-induced neuron survival requires TRPC channel function." *Nat Neurosci* 10(5): 537-538.
- Spezia Adachi, L. N., W. Caumo, et al. (2012). "Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model." *Brain Res* 1489: 17-26.
- Stangl, D. and S. Thuret (2009). "Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis." *Genes Nutr* 4(4): 271-282.
- Strekalova, T., Y. Couch, et al. (2011). "Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters." *Behav Brain Funct* 7: 9.
- Strekalova, T., R. Spanagel, et al. (2004). "Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration." *Neuropsychopharmacology* 29(11): 2007-2017.
- Strekalova, T. V., N. S. Kholod, et al. (2011). "[Molecular changes in inbred mice with individual vulnerability vs resilience to stress-induced depressive-like state]." *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 97(8): 843-851.
- Sweazea, K. L., M. Lekic, et al. (2010). "Comparison of mechanisms involved in impaired vascular reactivity between high sucrose and high fat diets in rats." *Nutr Metab (Lond)* 7: 48.
- Swinburn, B. A., G. Sacks, et al. (2011). "The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments." *Lancet* 378(9793): 804-814.
- Taliaz, D., A. Loya, et al. (2011). "Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor." *J Neurosci* 31(12): 4475-4483.

- Tamburella, A., V. Micale, et al. (2009). "Antidepressant properties of the 5-HT₄ receptor partial agonist, SL65.0155: behavioral and neurochemical studies in rats." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(7): 1205-1210.
- Torres, I. L., A. Buffon, et al. (2002). "Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats." *Pharmacol Biochem Behav* 74(1): 181-186.
- Torres, I. L., G. D. Gamaro, et al. (2001). "Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices." *Braz J Med Biol Res* 34(1): 111-116.
- Torres, I. L., G. D. Gamaro, et al. (2002). "Effects of chronic restraint stress on feeding behavior and on monoamine levels in different brain structures in rats." *Neurochem Res* 27(6): 519-525.
- Tryon, M. S., C. S. Carter, et al. (2013). "Chronic stress exposure may affect the brain's response to high calorie food cues and predispose to obesogenic eating habits." *Physiol Behav* 120: 233-242.
- Tyler, W. J., M. Alonso, et al. (2002). "From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning." *Learn Mem* 9(5): 224-237.
- van Heesch, F., J. Prins, et al. (2013). "Lipopolysaccharide-induced anhedonia is abolished in male serotonin transporter knockout rats: an intracranial self-stimulation study." *Brain Behav Immun* 29: 98-103.
- Vaynman, S. and F. Gomez-Pinilla (2006). "Revenge of the "sit": how lifestyle impacts neuronal and cognitive health through molecular systems that interface energy metabolism with neuronal plasticity." *J Neurosci Res* 84(4): 699-715.
- Vetter, M. L., L. F. Faulconbridge, et al. (2010). "Behavioral and pharmacologic therapies for obesity." *Nat Rev Endocrinol* 6(10): 578-588.
- Vogelzangs, N., S. B. Kritchevsky, et al. (2010). "Obesity and onset of significant depressive symptoms: results from a prospective community-based cohort study of older men and women." *J Clin Psychiatry* 71(4): 391-399.
- Waalén, J. (2014). "The genetics of human obesity." *Transl Res* 164(4): 293-301.
- Wang, C., R. J. Godar, et al. (2010). "Chronic administration of brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus reverses obesity induced by high-fat diet." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298(5): R1320-1332.
- Wang, J. H., F. Wang, et al. (2008). "Leptin regulated calcium channels of neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons by activation of different signal pathways." *Neuroscience* 156(1): 89-98.
- Williams, J., P. Scarborough, et al. (2014). "A systematic review of the influence of the retail food environment around schools on obesity-related outcomes." *Obes Rev* 15(5): 359-374.
- WILLINS, Rodowel Sue. *Fundamentos de Nutrição e Dietoterapia*. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- Willner, P., A. Towell, et al. (1987). "Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant." *Psychopharmacology (Berl)* 93(3): 358-364.

- Witkin, J. M., G. J. Marek, et al. (2007). "Metabotropic glutamate receptors in the control of mood disorders." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6(2): 87-100.
- Woods, S. C. and D. A. D'Alessio (2008). "Central control of body weight and appetite." *J Clin Endocrinol Metab* 93(11 Suppl 1): S37-50.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight.
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, acesso em 25 de fevereiro de 2015).
- Yau, Y. H. and M. N. Potenza (2013). "Stress and eating behaviors." *Minerva Endocrinol* 38(3): 255-267.
- Ye, Y., G. Wang, et al. (2011). "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression." *Neurosci Lett* 503(1): 15-19.
- Yeo, G. S., C. C. Connie Hung, et al. (2004). "A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay." *Nat Neurosci* 7(11): 1187-1189.
- Yon, M. A., S. L. Mauger, et al. (2013). "Relationships between dietary macronutrients and adult neurogenesis in the regulation of energy metabolism." *Br J Nutr* 109(9): 1573-1589.
- Yu, Y., Q. Wang, et al. (2009). "Energy-restricted pair-feeding normalizes low levels of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B mRNA expression in the hippocampus, but not ventromedial hypothalamic nucleus, in diet-induced obese mice." *Neuroscience* 160(2): 295-306.
- Zaben, M. J. and W. P. Gray (2013). "Neuropeptides and hippocampal neurogenesis." *Neuropeptides* 47(6): 431-438.
- Zakrzewska, K. E., I. Cusin, et al. (1997). "Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance." *Diabetes* 46(4): 717-719.

Demais produções

Artigos publicados no período de Doutorado

Macedo, I.C., Rozisky, J. R., Battastini, AMO, Ribeiro, M. F. M., Torres, I. L. S. Obesity and Chronic Stress Modulate Adenine Nucleotide Hydrolysis in Rat Blood Serum. International Journal for Pharmaceutical Research Scholars 3: 10 - 16, 2014.

de Oliveira, C., Scarabelot, V.L., Souza A., Oliveira, C.M. Medeiros, L.F., **Macedo I.C.**, Marques P.R., Cioato, S.G., Caumo, W., Torres, I.L.S. Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptin and triglycerides. Peptides 51, p.46 - 53, 2014.

Rozisky, J. R., Laste, G., **Macedo, I. C.**, Santos, V. S., Krolow, R., Noschang, C., Vanzella, C., Bertoldi, K., Lovatel, G. A., Souza, I. C. C., Siqueira, I. R., Dalmaz, C., Caumo, W., Torres, I. L. S. Neonatal Morphine Administration Leads to Changes in Hippocampal BDNF Levels and Antioxidant Enzyme Activity in the Adult Life of Rats. Neurochemical Research 38:494 - 503, 2013.

Laste, G., Vidor, L., **Macedo I.C.**, Rozisky, J.R., Medeiros, L., Souza, A., Meurer, L., De Souza, I.C.C., Torres, I.L. S., Caumo, W. Melatonin Treatment Entrain the Rest-Activity Circadian Rhythm in Rats With Chronic Inflammation. Chronobiology International 20: 1 - 12, 2013.

Rozisky J. R., Laste, G., Medeiros, L., Santos, V. S., Adachi, L. N., **Macedo, I.C.**, Caumo, W., Torres, ILS. Morphine Treatment in Neonate Rats Increases Exploratory Activities: Reversal by Antagonist D2 Receptor. British Journal of Medicine and Medical Research 4:1 - 10, 2013.

Laste, G., Rozisky, J.R., **Macedo, I.C.**, De Souza, A. , Santos, V. S., De Souza, I.C.C., Caumo, W., Torres, I.L.S. Spinal Cord Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Increase after Dexamethasone Treatment in Male Rats with Chronic Inflammation. Neuroimmunomodulation 20:119 - 125, 2013.

Laste, G., **Macedo, I.C.**, Rozisky, J. R., Silva, SR, Caumo, W., Torres, ILS Melatonin Administration Reduces Inflammatory Pain in Rats. Journal of Pain Research 5: 359-362, 2012.

Laste, G., Caumo, W., Adachi, L. N., Rozisky, J. R., **Macedo, I. C.**, Marques, P. R., Partata,W.A.,Fregni,F.,Torres,ILS. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. Experimental Brain Research 221:75 - 83, 2012.

Anexos

Anexo 1. Carta de aprovação do comitê de ética GPPG/HCPA



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 110455

Data da Versão do Projeto: 02/09/2011

Pesquisadores:

MARIA FLAVIA MARQUES RIBEIRO

ISABEL CRISTINA DE MACEDO

CARLA DE OLIVEIRA

CLEVERSON MORAES DE OLIVEIRA

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Título: MODELO DE OBESIDADE ASSOCIADO AO ESTRESSE CRÔNICO: EFEITO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E COMPORTAMENTO ALIMENTAR EM RATOS WISTAR.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.


Porto Alegre, 15 de setembro de 2011.
Dr. Alessandro Bersch Osvaldt
Coordenador da CEUA/HCPA