

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Graduação em Nutrição

Priscila Bárbara Zanini Rosa

**ALTERAÇÃO DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO INDUZIDA POR DIETA
HIPERCALÓRICA EM RATAS WISTAR**

Porto Alegre
2015

Priscila Bárbara Zanini Rosa

**ALTERAÇÃO DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO INDUZIDA POR DIETA
HIPERCALÓRICA EM RATAS WISTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial e obrigatório para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

Orientador: Prof^a Dr^a Maria Flávia Marques Ribeiro

Coorientador: Prof^a Dr^a Ana Lúcia Ceconello

Porto Alegre
2015

CIP - Catalogação na Publicação

Zanini Rosa, Priscila Barbara

Alteração da memória de reconhecimento induzida por
dieta hipercalórica em ratas Wistar / Priscila

Barbara Zanini Rosa. -- 2015.

40 f.

Orientadora: Maria Flávia Marques Ribeiro.

Coorientadora: Ana Lúcia Cecconello.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS,
2015.

1. dieta hipercalórica. 2. memória. I. Marques
Ribeiro, Maria Flávia, orient. II. Cecconello, Ana
Lúcia, coorient. III. Título.

Priscila Bárbara Zanini Rosa

**ALTERAÇÃO DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO INDUZIDA POR DIETA
HIPERCALÓRICA EM RATAS WISTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial e obrigatório para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova o trabalho de conclusão de curso elaborado por Priscila Bárbara Zanini Rosa, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

Comissão Examinadora:

Prof^a Dr^a Martine Elisabeth Hagen
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a Dr^a Carolina Guerini
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a Dr^a Maria Flávia Marques Ribeiro - Orientadora
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, 2015

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à minha família, minha mãe Jacqueline, meu pai Marcos e meu irmão André, por todo apoio e confiança que tiveram em mim, sem eles eu não teria chegado até aqui, eu amo vocês!

Agradeço às minhas colegas de faculdade, Laura Fritsch, Christy Belin, Deisi Shimtz, Emanuelle Fróes, Natália Averbuch e Gabriela Niches (minhas eternas “poias”) pelas parcerias nos trabalhos, nas provas, nos momentos complicados e também pelos momentos de felicidade e descontração. Um agradecimento especial a Gabriela Niches que esteve ao meu lado durante toda a faculdade, nas aulas, no trabalho, no TCC (indo finais de semana comigo para realizar o experimento) e nas dezenas de cafés que tomamos juntas, obrigada por tudo. Agradeço também aos meus amigos, Renata Máximo, Lucas Schindel e Juliana Mutti, por apesar da distância e da falta de tempo estarem sempre presentes e não terem saído do meu lado; e ao meu amigo Rodrigo Leal, por me ouvir e me aconselhar sempre que precisei.

Um muito obrigado ao pessoal do Laboratório de Interação Neuro-Humoral, Bruno Arbo, Cláudia Marques, Rafael Fabres, Felipe Schuler e Gabriela Niches, por toda ajuda nos experimentos e seminários e pelos momentos de descontração no laboratório. E também, a minha co-orientadora, Ana Lúcia Ceconello, que me ajudou em toda logística do TCC, compareceu aos finais de semana para o experimento com lanches e que sempre esteve presente em todos os momentos.

E por fim, mas não menos importante, um grande agradecimento à minha orientadora Maria Flávia Marques Ribeiro, por me acolher desde o 3º semestre e confiar no meu trabalho e potencial. Obrigada por ter me proporcionado grande aprendizado e senso crítico e ser minha inspiração como profissional. Obrigada também por todos os conselhos científicos e existenciais.

“A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre”.

Louis L'amour

Resumo

A obesidade é um problema de saúde pública relacionada a um padrão alimentar inadequado. A atividade inflamatória subsequente ao aumento do tecido adiposo está associada a vários prejuízos como neuroinflamação, resistência periférica e central à insulina, resistência à leptina e déficit cognitivo. O déficit cognitivo é muito característico da Doença de Alzheimer, a qual acomete grande parte dos idosos, principalmente do sexo feminino. Porém, há poucos estudos investigando se essa alteração pode ocorrer em adultos do sexo feminino, quando submetidos a uma dieta hipercalórica. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de uma dieta hipercalórica sobre a memória de reconhecimento em ratas Wistar adultas e investigar o envolvimento de alterações metabólicas, caso seja encontrado prejuízo na memória. Ratas Wistar adultas foram tratadas por 22 semanas com dieta padrão (2,95 kcal/g) ou dieta hipercalórica (3,44 kcal/g). Na 21ª semana de dieta foi realizado um teste de locomoção para avaliar a atividade locomotora dos animais e foi feita a avaliação da função cognitiva, onde utilizou-se um teste comportamental de reconhecimento de objetos. Uma semana após, no período de diestro, os animais foram mortos por decapitação e o sangue troncular foi coletado para dosagem sérica de TNF- α , IL1- β , leptina e insulina por ELISA e glicose por kit enzimático. O hipocampo foi coletado para posterior dosagem de TNF- α , IL1- β e insulina por ELISA e Akt por Western Blot. A análise estatística foi realizada por Teste t ($p < 0,05$). Os animais que consumiram a dieta hipercalórica tiveram um maior consumo em gramas e em calorias, maior ganho de peso total e maior índice lipossomático em relação ao grupo controle. Não houve alteração na capacidade locomotora dos animais. O teste de reconhecimento de objetos indicou que os animais do grupo dieta hipercalórica não obtiveram consolidação de memória. Quanto aos parâmetros séricos apenas foi observada diferença significativa nas concentrações de glicose e leptina, as quais aumentaram no grupo dieta hipercalórica. No hipocampo, nenhum parâmetro avaliado apresentou diferença significativa. Conclui-se que esta dieta foi eficaz para causar obesidade e desencadear uma alteração de memória. Isto pode estar relacionado com os níveis séricos aumentados de leptina, porém não tem associação com inflamação e resistência insulínica periférica ou central, no modelo de obesidade utilizado.

Palavras-chave: obesidade; déficit cognitivo; dieta hipercalórica.

Abstract

Obesity is a public health problem that is closely related to an inadequate dietary pattern. The subsequent inflammatory activity with increased adipose tissue is associated with various losses caused by obesity as central and peripheral insulin resistance, leptin resistance, neuroinflammation and cognitive impairment. It is known that cognitive impairment is very characteristic of Alzheimer's disease, which affects many elderly people, especially women. However, there are few studies investigating whether this change may occur in female adults, when subjected to a high calorie diet. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of a high calorie diet on object recognition memory in adult female rats and investigate the involvement of metabolic disorders (peripheral and central), if found impaired memory. Adult female Wistar rats were treated for 22 weeks with standard diet (2.95 kcal/g) or hypercaloric diet (3.44 kcal/g). In the 21st week, locomotion test was performed to assess the locomotor activity of the animals was taken and the evaluation of cognitive function, where we use a behavioral pattern recognition objects. One week after, in the dioestrus period, the animals were killed by decapitation and truncal blood was collected for serum TNF- α , IL1- β , leptin and insulin by ELISA and glucose by enzymatic kit. The hippocampus was collected for later dosage of TNF- α , IL1- β and insulin by ELISA and Akt by Western Blot. The statistical analysis was conducted by t test ($p < 0.05$). The animals fed the high-calorie diet had a higher intake in grams and calories, total gain greater and greater weight liposomal index compared to the control group. There were no changes in locomotor ability of animals. The object recognition test showed that the animals of the high calorie diet group did not obtain memory consolidation. As for serum parameters was only observed significant difference in glucose and leptin, which increased in animals that received hypercaloric diet. In the hippocampus, any evaluated parameters showed a significant difference between the groups. We can conclude that this high calorie diet was effective in causing obesity and trigger a memory change. This may be related to the increased serum levels of leptin but has no association with inflammation or central and peripheral insulin resistance in obesity model used.

Keywords: obesity; cognitive impairment; calorie diet.

Lista de Figuras

Figura 1. Papel da neuroinflamação na sinalização da insulina e a consequente alteração da plasticidade sináptica e memória.....	14
Figura 2. Esquema do teste de reconhecimento de objetos.....	21
Figura 3. Consumo alimentar	25
Figura 4. Ganho de peso e ILS.....	25
Figura 5. Locomoção no campo aberto	26
Figura 6. Teste de reconhecimento de objetos.....	27
Figura 7. Parâmetros séricos.....	28
Figura 8. Parâmetros centrais	29

Lista de Abreviaturas e Siglas

BHE = Barreira Hemato-Encefálica

DA = Doença de Alzheimer

IL1- β = Interleucina 1 Beta

ILS = Índice Lipossomático

RI = Resistência à Insulina

SNC = Sistema Nervoso Central

TNF- α = Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRO = Teste de Reconhecimento de Objetos

UFRGS = Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 HIPÓTESE	17
3 OBJETIVOS	17
3.1 GERAIS	17
3.2 ESPECÍFICOS	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 LOCAL	18
4.2 ANIMAIS	18
4.3 DIETA	18
4.4 CONSUMO ALIMENTAR E GANHO DE PESO TOTAL	19
4.5 ACOMPANHAMENTO DAS FASES DO CICLO ESTRAL	19
4.6 TESTES COMPORTAMENTAIS	20
4.6.1 Teste de Locomoção no Campo Aberto	20
4.6.2 Teste de Reconhecimento de Objetos	21
4.7 EUTANÁSIA, OBTENÇÃO DOS TECIDOS E DESCARTE DE RESÍDUOS	22
4.8 DOSAGENS SÉRICAS	23
4.9 DOSAGENS NO HIPOCAMPO	23
4.10 EXPRESSÃO PROTEICA (WESTERN BLOT)	23
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5 RESULTADOS	25
5.1 CONSUMO ALIMENTAR, GANHO DE PESO TOTAL E ILS	25
5.2 TESTE DE LOCOMOÇÃO NO CAMPO ABERTO	26
5.3 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	26
5.4 PARÂMETROS SÉRICOS	27
5.5 PARÂMETROS CENTRAIS	29
6 DISCUSSÃO	30
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
8 REFERÊNCIAS	34

1 Introdução

A obesidade é uma doença crônica multifatorial caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal (WHO,1998). Segundo dados da VIGITEL (2013), 50,8% dos brasileiros estão acima do peso ideal e, destes, 17,5% são obesos, o que torna a obesidade um problema de saúde pública. De modo geral, ela está muito relacionada com um elevado consumo de alimentos ricos em açúcar, gorduras saturadas e trans e pelo baixo consumo de carboidratos complexos e fibras (IBGE, 2011). Esse padrão alimentar, mais conhecido como “dieta ocidental” ou “dieta moderna”, surgiu devido a diversas modificações na alimentação e vem sendo incorporada crescentemente pela população (BRASIL, 2006).

O tecido adiposo, o qual está aumentado na obesidade, é considerado um órgão endócrino, metabolicamente ativo, que desempenha algumas funções importantes como a manutenção do balanço energético, a termorregulação, metabolismo de lipídios e da glicose, modulação da função hormonal e reprodutiva, entre outras. Além disso, o tecido adiposo tem um papel fundamental nas cascatas inflamatórias, pró-coagulantes e antifibrinolíticas vasoativas, o que sugere uma influência direta sobre o processo inflamatório (RODRIGUEZ *et al.*, 2009; FLORES-LÁZARO *et al.*, 2011). Em um contexto de obesidade, observa-se que cerca de 70 a 80% dos indivíduos sofrem um processo de remodelamento tanto estrutural quanto funcional do tecido adiposo. Isso permite a infiltração de macrófagos, que por sua vez secretam grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias (como por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa, TNF- α , e a interleucina 1 beta, IL1- β), provocando assim uma reação inflamatória aguda. Caso isso não seja resolvido adequadamente, instala-se um quadro de inflamação crônica, o que caracteriza a obesidade como uma condição crônica de baixo grau de inflamação (UYSAL *et al.*, 1997; HEILBRONN & CAMPBELL, 2008; CLÀRIA *et al.*, 2012).

Esse quadro de inflamação instalado pela obesidade pode desencadear alterações metabólicas, tanto periféricas quanto centrais. Na periferia, a resistência à insulina (RI) é a principal disfunção observada (IZAOLA *et al.*, 2015). A insulina é um hormônio anabólico que regula a homeostase da glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e

umentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação proteica (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). Segundo Ascaso *et al.* (2003), a resistência à insulina é uma “condição patológica caracterizada por falta de resposta fisiológica dos tecidos periféricos à ação da insulina, levando a alterações metabólicas e hemodinâmicas”. Um dos fatores que levam a isso é o fato das citocinas pró-inflamatórias (principalmente o TNF- α), na obesidade, serem capazes de diminuir a expressão dos transportadores de glicose (GLUT-4) na superfície celular, diminuir a fosforilação do substrato 1 dos receptores de insulina (IRS-1) e diminuir a fosforilação específica do receptor da insulina, o que gera um quadro de hiperinsulinemia (ARSLAN *et al.*, 2010).

No sistema nervoso central (SNC) acontece da mesma forma: as citocinas pró-inflamatórias (que conseguem ultrapassar a barreira hemato-encefálica) provocam uma inflamação no encéfalo (neuroinflamação), gerando uma resistência central à insulina (AKIYAMA *et al.*, 2000; CHAKRABORTY *et al.*, 2010). Neste tecido, a insulina é responsável por produzir sensação de saciedade e aumentar o gasto energético (IZAOLA *et al.*, 2015). Além disso, em alguns estudos recentes, viu-se que a insulina é importante para a sobrevivência neuronal e função do cérebro (MCNAY & RECKNAGEL, 2011) e também participa dos processos de aprendizagem, memória e plasticidade sináptica (CHIU *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2010; MCNAY & RECKNAGEL, 2011). A Figura 1 ilustra o papel da neuroinflamação na sinalização da insulina e a consequente alteração na memória e plasticidade sináptica. Observa-se que, sob condições fisiológicas, a insulina se liga no seu receptor de superfície celular, o que desencadeia sua autofosforilação e permite a fosforilação do IRS1, que ativa a enzima PI3k, gerando respostas celulares que irão facilitar a plasticidade sináptica e a memória. Entretanto, sob condições de neuroinflamação, o aumento da ligação do TNF- α com seu receptor, ativa as cinases JNK, PKR e IKK, resultando na fosforilação de serinas inibidoras do IRS-1; concomitantemente, há remoção do receptor de insulina da superfície celular, gerando um defeito na sinalização da insulina que irá causar uma disfunção sináptica e um prejuízo na memória (FELICE *et al.*, 2014).

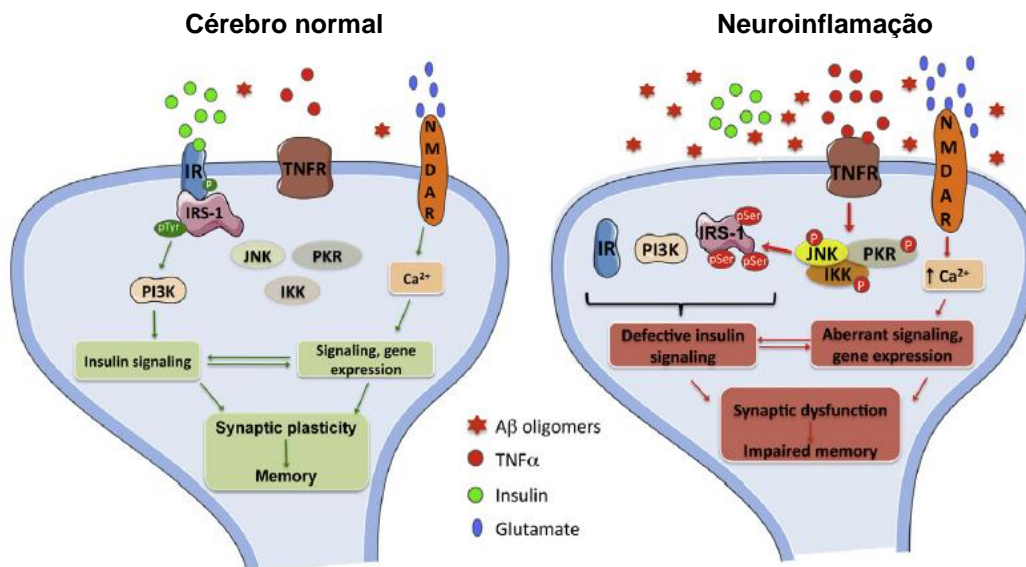


Figura 1. Papel da neuroinflamação na sinalização da insulina e a consequente alteração da plasticidade sináptica e memória (figura adaptada de Felice et al., 2014).

Alguns autores sugerem que alterações na ação da insulina e mudanças no metabolismo da glicose (periféricas e centrais) podem levar a um risco maior de desenvolvimento de demência (LUCHSINGER et al., 2004; JANSON et al., 2004), principalmente devido à inibição da via PI3K/Akt, uma das principais vias de sinalização da insulina (LIU et al., 2009). No mesmo sentido, outros autores têm encontrado uma associação do prejuízo da sinalização da insulina na periferia e no cérebro com déficit cognitivo em ratos alimentados com dieta hiperlipídica/hipercalórica (PINTANA et al., 2012; PINTANA et al., 2013; KISHI et al., 2014). Isso é reforçado por resultados de Baker e colaboradores (2010) que mostram que a resistência à insulina nos tecidos periféricos poderia facilitar a resistência à insulina no cérebro por reduzir a captação de glicose no mesmo, aumentando o risco de desenvolvimento de demência. Sendo assim, parece que defeitos na sinalização da insulina no cérebro podem dar origem a déficits cognitivos e disfunção neuronal, que são característicos da Doença de Alzheimer (FELICE *et al.*, 2014).

Outra disfunção importante na obesidade, também podendo ser causada pela inflamação, é a resistência à ação da leptina. A leptina é um hormônio secretado

principalmente por adipócitos, sendo produzida em maior quantidade pelo tecido adiposo subcutâneo do que pelo tecido adiposo visceral (MONTAGUE *et al.*, 1998). Ela é responsável por sinalizar ao SNC a inibição do consumo de alimentos e a diminuição do peso corporal (ZHANG *et al.*, 1994). Sabe-se que indivíduos obesos apresentam altos níveis circulantes de leptina no sangue (AHIMA, 2008), entretanto observa-se que há uma incapacidade deste hormônio de realizar sua função. Estima-se que a presença de altos níveis de leptina no plasma seria um indicativo de resistência a este hormônio, seja pela alteração da sua síntese e/ou secreção, por alterações da passagem de leptina pela barreira hemato-encefálica (BHE), por anomalias nos receptores ou posterior sinalização (ROMERO & ZANESCO, 2006). Outra hipótese seria que as citocinas pró-inflamatórias, oriundas de uma inflamação periférica (como ocorre na obesidade), poderiam ultrapassar a BHE e antagonizarem a ação da leptina no hipotálamo (SIGNORE *et al.*, 2008).

Da mesma forma como na resistência à insulina, alguns estudos demonstram que a resistência à leptina no cérebro pode estar envolvida com o prejuízo da função cognitiva (GRILLO *et al.*, 2011a; FADEL *et al.*, 2013). Sabe-se que o receptor de leptina é expresso em várias regiões do cérebro, incluindo o hipocampo (MERCER *et al.*, 1996; HUANG *et al.*, 1996), e que este hormônio é capaz de participar na regulação da plasticidade sináptica (GRILLO *et al.*, 2011b; MCGREGOR *et al.*, 2015). Há evidências de que ratos que apresentam alterações na resposta à ação da leptina têm a capacidade de aprendizagem espacial e plasticidade sináptica prejudicadas (OOMURA *et al.*, 2006; HARVEY *et al.*, 2006). Já quando a leptina é introduzida diretamente no hipocampo, há um aumento na proliferação de precursores neuronais e uma diminuição da neurodegeneração (DOHERTY *et al.*, 2011; PEREZ-GONZALEZ *et al.*, 2011).

O hipocampo é a principal região do cérebro envolvida com processos de aprendizagem e memória (EICHENBAUM & COHEN, 2001). A memória pode ser dividida em dois grandes grupos: memória espacial e memória não-espacial. Um subtipo de memória não-espacial é a memória de reconhecimento, que se define pela capacidade de distinguir estímulos novos de estímulos familiares. Ela depende da integridade do lobo temporal medial, o qual inclui o hipocampo, córtex perirrinal, córtex entorrinal e córtex para-hipocampal (SQUIRE *et al.*, 1991; SQUIRE *et al.*, 2007). O

reconhecimento prejudicado de objetos familiares e as dificuldades em distingui-los dos objetos novos é um dos primeiros traços de declínio cognitivo, que é observado em pacientes com doença de Alzheimer e esquizofrenia, os quais têm uma memória declarativa prejudicada (GRADY *et al.*, 2001; PINKHAM *et al.*, 2007; FORSTL & KURZ, 1999; WEISS & HECKERS, 2001; CIRILLO & SEIDMAN, 2003)

A doença de Alzheimer (DA) é uma das principais doenças em que há disfunção cognitiva. Ela é uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal, sendo a forma mais comum de demência associada à idade avançada (PAUWELS *et al.*, 2012; YU & ZHENG, 2011), com maior prevalência no sexo feminino (NAHID *et al.*, 2007). Os sinais presentes na DA incluem perda cognitiva progressiva, afetando principalmente a memória (KATSOURI & GEORGOPOULOS, 2011). Sabe-se que o envelhecimento é um fator de alto risco tanto para RI / *diabetes mellitus* quanto para DA (BLÁZQUEZ *et al.*, 2014). Entretanto, alguns poucos estudos vêm relacionando os distúrbios metabólicos da obesidade com a função cognitiva em adultos-jovens. Fergenbaum *et al.* (2009) relatam que, não só os idosos, mas também adultos-jovens que têm comorbidades relacionadas com a obesidade apresentam disfunção cognitiva. Corroborando, Bove e colaboradores (2013) revelam que a resistência à insulina pode ser capaz de afetar a função cognitiva nessa mesma população. Além disso, dos estudos que vem sendo feitos com esta faixa etária, muitos são realizados com o sexo masculino. Jurdak *et al.* (2008) e Chepulis *et al.* (2009) alimentaram ratos machos adultos com uma dieta rica em açúcar e viram que os animais apresentaram prejuízo de aprendizagem e memória. Eles também sugerem que isto pode ter ocorrido devido a uma alteração na sensibilidade a insulina e no metabolismo da glicose. Assim, a resistência à insulina é uma condição que afeta seriamente a qualidade de vida e longevidade dos idosos, embora nos últimos anos também esteja afetando os jovens obesos (BLÁZQUEZ *et al.*, 2014), principalmente do sexo masculino.

Desse modo, considerando que (1) uma dieta hipercalórica provoca obesidade, a qual resultará em disfunções metabólicas que estão envolvidas na alteração da função cognitiva, e que (2) há poucos estudos indicando que essa alteração pode ocorrer em adultos do sexo feminino, torna-se interessante estudar o que aconteceria com a memória dessa faixa etária, do sexo feminino, em resposta a uma dieta hipercalórica.

2 Hipótese

Ratas Wistar adultas-jovens submetidas a uma dieta hipercalórica apresentam declínio da função cognitiva e este declínio poderia estar relacionado com alterações metabólicas causadas pela obesidade.

3 Objetivos

3.1 Gerais

Avaliar o efeito de uma dieta hipercalórica sobre a memória de reconhecimento de objetos em ratas Wistar adultas-jovens e investigar o envolvimento de alterações metabólicas (periféricas e centrais) que poderiam estar relacionadas a esses efeitos.

3.2 Específicos

- Avaliar se a dieta empregada neste estudo causa obesidade e alteração no consumo alimentar;
- Investigar se a dieta hipercalórica pode alterar o desempenho no teste de reconhecimento de objetos;
- Avaliar se a dieta hipercalórica modifica as concentrações séricas de parâmetros metabólicos como glicose, leptina e insulina;
- Determinar se a dieta hipercalórica é capaz de induzir inflamação sistêmica, avaliada pelos níveis séricos de TNF α e IL1- β ;
- Avaliar se esta dieta pode induzir neuroinflamação no hipocampo, determinada pelos níveis hipocâmpais de TNF- α e IL1- β ;
- Determinar se a dieta hipercalórica pode induzir uma resistência central à insulina, verificada pela concentração de insulina e expressão de pAkt/Akt no hipocampo.

4 Material e Métodos

4.1 Local

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Interação Neuro-Humoral (LINH) do Departamento de Fisiologia, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.2 Animais

Foram utilizadas 30 ratas Wistar fêmeas adultas-jovens (60 dias de idade no início do tratamento), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Os animais foram separados em grupos de, no máximo, cinco por caixa, com livre acesso à dieta e à água, e permaneceram em ambiente com temperatura controlada entre $22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas (das 5 às 17h). Assim, foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle e grupo dieta hipercalórica. A duração do tratamento (dieta) foi de 22 semanas. Os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas brasileiras (GOLDIM, 1997). O projeto foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob número 19788.

4.3 Dieta

A dieta oferecida aos animais do grupo controle foi a ração padrão de biotério (NUVILAB CR-1), com 2,95 kcal/g e composta de 4,5% de lipídios, 22% de proteínas e 55% de carboidratos. A dieta experimental escolhida foi uma dieta palatável hipercalórica (produzida no próprio laboratório e analisada pelo Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia - UFRGS) com 3,44 kcal/g e composta de aproximadamente 5,1% de lipídios, 18,4% de proteínas e 68,9% de carboidratos. A mesma foi disponibilizada à vontade, todos os dias, aos animais do grupo dieta, sendo oferecida, além disso, dieta padrão e água. Na tabela 1 observa-se a composição da dieta hipercalórica.

Ingredientes	Medida
Ração triturada	1 kg
Caseína	150 g
Maisena	500 g
Açúcar	300 g
Banha de porco	50 g
Agi sal	7,4 g
CMC	20 g
Água destilada	1 L

Tabela 1. Composição da dieta hipercalórica

4.4 Consumo alimentar e ganho de peso total

A ração era pesada antes de ser fornecida aos animais. Vinte e quatro horas após o fornecimento realizava-se a pesagem da ração restante. A medida do consumo foi calculada pelo peso da ração fornecida menos o peso da ração restante. Os animais foram pesados, individualmente, no primeiro dia antes do oferecimento da dieta e no dia da morte, para posterior cálculo do ganho de peso total.

4.5 Acompanhamento das fases do ciclo estral

Após 19 semanas de dieta, o lavado vaginal de cada animal foi analisado diariamente. A coleta foi realizada com auxílio de uma pipeta plástica contendo soro fisiológico, a qual era introduzida no canal vaginal da fêmea e o soro fisiológico era injetado para coleta do lavado vaginal. O líquido coletado era depositado sobre uma lâmina de vidro e analisado a fresco no microscópio óptico. Pela análise da composição celular do lavado, inferia-se em qual fase do ciclo estral o animal se encontrava.

O ciclo estral de ratas Wistar é dividido em quatro fases: proestro, quando o lavado é composto principalmente de células epiteliais (período pré-ovulatório); estro, quando o lavado é composto principalmente de células epiteliais cornificadas (fase de receptividade sexual, em que há aumento dos níveis de estradiol); metaestro, quando o lavado é composto de células epiteliais cornificadas e leucócitos (desenvolvimento de folículos do ovário); e diestro, quando o lavado é composto principalmente por

leucócitos (fase folicular, em que há baixos níveis de estradiol) (SINGLETERY *et al.*, 2005; BECKER *et al.*, 2005).

Esse acompanhamento é importante para que se submeta todos os animais ao teste de reconhecimento de objetos na mesma fase do ciclo estral, pois sabe-se que dependendo dos níveis de estradiol, as fêmeas podem ter diferentes desempenhos. Assim, todas as ratas foram submetidas ao teste na fase de diestro, quando os níveis de estradiol não estão elevados, não interferindo no resultado final (WARREN & JURASKA, 1997).

4.6 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados após 21 semanas de dieta. Todas as ratas foram submetidas aos testes descritos a seguir.

4.6.1 Teste de locomoção no campo aberto

Este teste tem como objetivo avaliar a capacidade locomotora dos animais. Uma vez que o teste de reconhecimento de objetos requer que o animal se desloque e explore os mesmos e, havendo alguma alteração na locomoção, este teste será prejudicado. Além disso, teoricamente a dieta hipercalórica causa obesidade e os animais obesos podem ter problemas de locomoção, não realizando o teste de reconhecimento de objetos adequadamente. Para isso, os animais foram colocados no quadrante inferior esquerdo de um campo aberto de 50x50 cm delimitado por quatro paredes com 20 cm de altura, sendo três de madeira e uma de vidro transparente. O animal era colocado no campo aberto durante 5 minutos e cada vez que ele se locomovia, era disparado um cronômetro. Ao final do teste foi contabilizado o tempo de locomoção do animal e foi calculado a porcentagem de tempo que este se locomoveu em relação ao tempo de permanência no campo (5 minutos) (teste adaptado de BARROS *et al.*, 2006).

4.6.2 Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos (ENNAUCER & DELACOUR, 1988) é um teste comportamental utilizado para acessar memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural do animal a explorar mais o objeto novo em detrimento ao objeto familiar, num contexto conhecido.

Esse teste foi realizado na mesma caixa utilizada para o teste de locomoção (campo aberto), tal como descrito por Dere *et al.* (2005). Todos os animais foram habituados na caixa experimental na ausência de qualquer estímulo comportamental específico durante 20 minutos por quatro dias. Os objetos, feitos de metal ou vidro, foram fixados ao piso da arena com fita adesiva. No primeiro dia (dia do treino), os animais foram colocados na arena contendo dois objetos diferentes (A e B) para explorá-los livremente por 5 minutos. No dia seguinte (dia do teste), um dos objetos foi substituído por um novo objeto (objeto C) e o rato foi introduzido na arena por mais 5 minutos, como mostra a Figura 2. A exploração foi definida como cheirar ou tocar no objeto com o nariz e/ou patas dianteiras. Virar ou sentar no objeto não foi considerado comportamento exploratório. O tempo gasto para explorar cada objeto foi cronometrado no momento do teste e expresso como uma porcentagem do tempo total de exploração calculado em segundos (ROSSATO *et al.*, 2007).

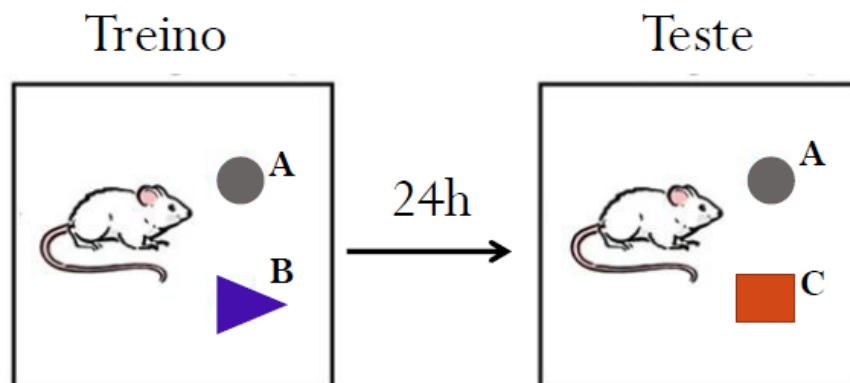


Figura 2. Esquema do teste de reconhecimento de objetos.

4.7 Eutanásia, obtenção dos tecidos e descarte de resíduos

Ao final de 22 semanas do início do experimento, quando as ratas estavam no período de diestro do ciclo estral, elas foram mortas por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos para posterior realização das análises bioquímicas. O método escolhido para eutanásia baseia-se no fato deste ser um método eficaz que produz mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. A morte dos animais sob anestesia, apesar de desejável, é incompatível com nossos experimentos porque todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (BROWN *et al.*, 2005; SAHA *et al.*, 2005). Os animais foram decapitados em ambiente exclusivamente destinado à morte dos animais, com exaustão e higienização completa de todo o material entre a morte de um animal e outro.

Após a morte, foi feita a dissecação do encéfalo em superfície gelada. O hipocampo foi removido e congelado para posteriores análises pelo método de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) e pela técnica de Western Blot. O sangue troncular foi coletado em tubos de ensaio contendo gel separador e, após aproximadamente duas horas, o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 1000xg. O soro coletado foi separado em alíquotas e estocado a -20°C até o momento das análises bioquímicas. O tecido adiposo visceral foi retirado e pesado para cálculo do índice lipossomático, onde o peso da gordura visceral é dividido pelo peso corporal do animal.

As carcaças e demais resíduos biológicos foram colocados em sacos plásticos identificados com o símbolo de risco biológico e congelados em freezer (-20°C), para serem posteriormente encaminhados para coleta e eliminação por empresa especializada.

4.8 Dosagens séricas

A concentração de glicose sérica foi dosada com kit enzimático (da marca Labtest) por espectrofotometria, de acordo com as instruções do fabricante.

As dosagens séricas de insulina, leptina, TNF- α e IL1- β foram realizadas pela técnica de ELISA, de acordo com as orientações dos fabricantes (kits da marca Milipore para insulina e leptina; kit da marca Invitrogen para TNF- α ; e kit da marca Abcam para IL1- β).

Para cálculo do HOMA-IR, utilizou-se a fórmula: Insulinemia (μ UI/mL) x Glicemia (mmol/L) / 22,5.

4.9 Dosagens no hipocampo

Insulina, TNF α e IL1- β foram dosados nos homogeneizados de hipocampo, pelo método de ELISA (com os kits das marcas citadas anteriormente), e os resultados foram normalizados para a quantidade de proteína no tecido, mensurada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.10 Expressão proteica (Western Blot)

Para a medida da expressão da proteína AKT e AKT fosforilada no hipocampo, este foi homogeneizado com tampão de lise (PIK - NaCl 150mM, Tris 20mM, EDTA 5mM, glicerol 10%, NP 40 10% + PMSF: um inibidor de protease, 1mM, pH de 7,4). O homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos a 7000xg em centrífuga refrigerada e o sobrenadante foi coletado. Após quantificação de proteínas totais do sobrenadante pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), as proteínas foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio). O homogeneizado de cada amostra foi diluído em tampão PIK de forma que cada amostra pipetada no gel tivesse a mesma quantidade de proteínas totais. A cada amostra diluída foi adicionado tampão de carga Laemmli (Tris 65mM, SDS 10%, Glicerol 50 %, azul de bormofenol 0,03%) e as mesmas foram aquecidas a 90°C durante 2 min antes da carregar o gel. O padrão de peso molecular (Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers)

correu no mesmo gel. O tempo de corrida foi de aproximadamente 3h, com gel 10%, a 100 mV de voltagem. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond; Amersham, EUA), utilizando um sistema de transferência eletroforética. As membranas foram então incubadas com 10% de leite em pó em TTBS (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7,5; 150 mmol/L NaCl; 0,05 % Tween-20, pH 7,4) durante 60 minutos.

As membranas foram incubadas durante 16 a 18 horas a 4° C com os anticorpos primários diluídos em TTBS. Foram utilizados anticorpos policlonais de coelho para pAkt Ser473-(60 kDa) e Akt (60 kDa) (Santa Cruz Biotechnology). Após a lavagem com TTBS, as membranas foram incubadas durante 2 h à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (Millipore). Todas as incubações foram realizadas sob agitação constante. Antes de proceder à revelação por quimiluminescência, as membranas foram lavadas por três períodos de 10 minutos com TBS (TrisHCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). A reação de quimiluminescência ocorreu pelo uso de um sistema de detecção baseado em substratos luminescentes (ácido p-cumárico e luminol) e peróxido de hidrogênio, com exposição das membranas ao filme autorradiográfico Hyperfilm (Amersham) por aproximadamente 1 minuto. A autorradiografia gerada foi analisada por meio do software Image J®.

Para evitar as variações, as amostras dos grupos experimentais foram processadas em paralelo. Os valores da expressão da pAkt e Akt total foram expressos como unidades densitométricas arbitrárias.

4.11 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados através de Teste *t* Student (dados paramétricos), exceto para os dados de TNF- α no hipocampo, onde utilizou-se o Teste de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Foram expressos pela média \pm erro padrão, utilizando o software GraphPad Prism®, e as diferenças entre as médias foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Consumo alimentar, ganho de peso total e ILS

Os animais que consumiram a dieta hipercalórica tiveram um maior consumo em gramas ($p=0,0110$) e em calorias ($p=0,0001$) em relação aos alimentados com a dieta padrão, ilustrado na Figura 3. Conseqüentemente, os animais do grupo dieta hipercalórica apresentaram um maior ganho de peso total ($p=0,0002$) e um maior ILS ($p=0,0001$) em relação aos animais que consumiram a dieta padrão, como mostra a Figura 4.

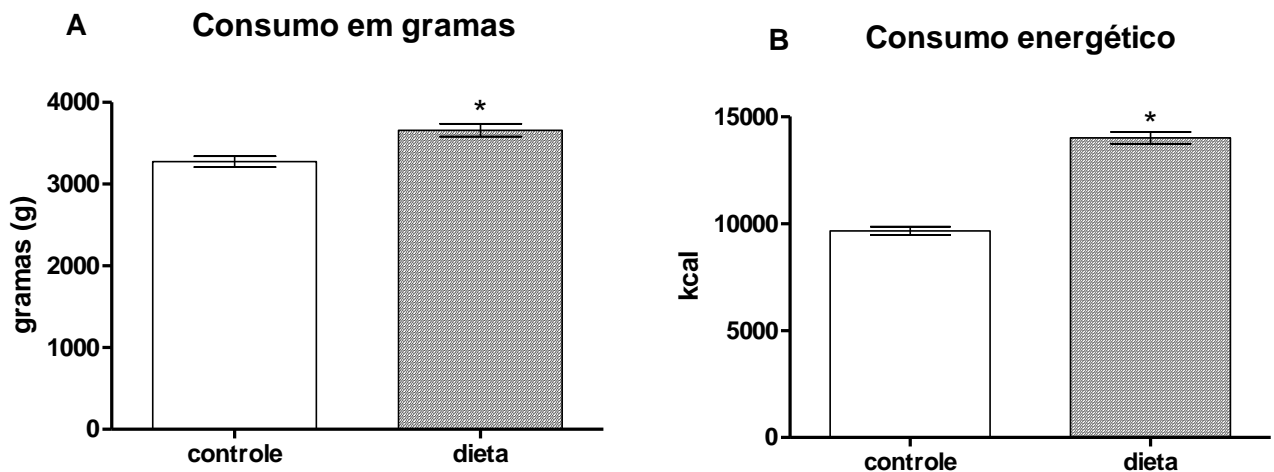


Figura 3. Consumo alimentar. **A) Consumo em gramas:** os animais do grupo dieta consumiram maior quantidade em gramas do que o grupo controle ($p=0,0110$; $n=16$). **B) Consumo energético em kcal:** os animais do grupo dieta consumiram mais calorias em relação ao grupo controle ($p=0,0001$; $n=16$).

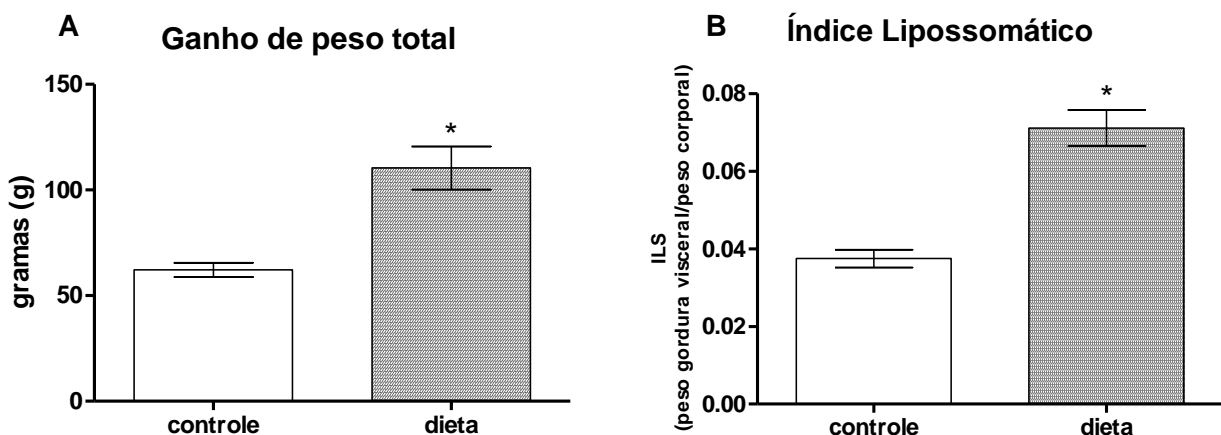


Figura 4. Ganho de peso e ILS. **A) Ganho de peso total:** o grupo dieta hipercalórica apresentou ganho de peso maior do que o grupo controle ($p=0,0002$; $n=15$ por grupo). **B) Índice lipossomático:** o grupo dieta hipercalórica apresentou ILS maior que o grupo controle ($p=0,0001$; $n=15$ por grupo).

5.2 Teste de locomoção no campo aberto

No teste de locomoção, os animais que consumiram a dieta hipercalórica não tiveram um percentual de tempo de locomoção estatisticamente diferente dos animais que consumiram a dieta controle ($p=0,3250$). Isso mostra que a obesidade não interferiu na atividade locomotora dos ratos do grupo com dieta hipercalórica, como mostra a Figura 5.

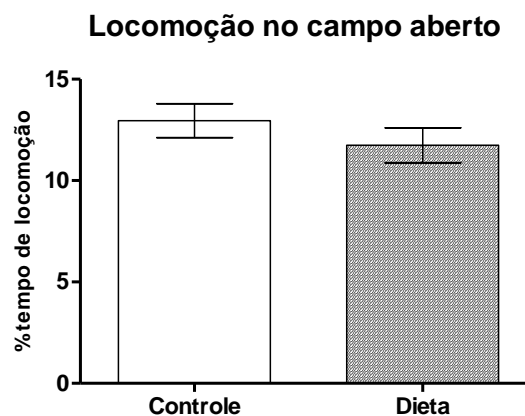


Figura 5. Locomoção no campo aberto. O grupo dieta hipercalórica não apresentou diferença significativa no percentual de tempo de locomoção em relação ao grupo controle ($p < 0,3250$); $n = 13$ a 15 por grupo.

5.3 Teste de reconhecimento de objetos

Quanto ao teste de reconhecimento de objetos, no dia do treino, ambos os grupos exploraram por tempos iguais os objetos A e B (Controle - objeto A: $11,81 \pm 0,87$ s; objeto B: $12,39 \pm 1,42$ s. Dieta - objeto A: $11,63 \pm 1,05$ s; objeto B: $11,35 \pm 1,27$ s). No dia do teste, os animais do grupo controle exploraram significativamente mais o objeto C em relação ao A (objeto A: $6,57 \pm 1,08$ s; objeto C: $15,54 \pm 1,5$ s). Já os animais do grupo dieta hipercalórica gastaram o mesmo tempo explorando os objetos A e C (objeto A: $9,28 \pm 1,09$ s; objeto C: $11,62 \pm 0,87$ s), mostrando que não houve consolidação de memória, ilustrado na Figura 6.

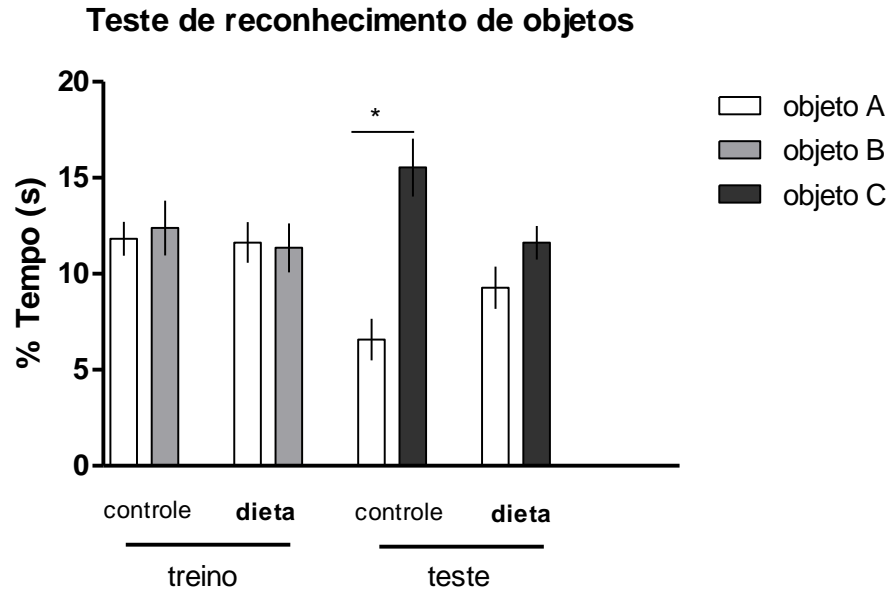


Figura 6. Teste de reconhecimento de objetos. No dia do teste, os animais do grupo controle exploraram mais o objeto novo (objeto C) do que o objeto conhecido (objeto A), enquanto os animais do grupo dieta gastaram o mesmo tempo explorando os objetos A e C ($p < 0,05$; $n = 10$ a 14).

5.4 Parâmetros séricos

A dieta hipercalórica provocou um aumento significativo dos níveis séricos de glicose ($p=0,036$), entretanto não houve diferença significativa nos níveis de insulina ($p=0,123$), bem como no HOMA-IR ($p=0,0766$), como mostra as figuras 7A, 7B e 7C, respectivamente. Em relação aos níveis de leptina sérica, houve um aumento significativo nos animais do grupo dieta hipercalórica ($p=0,049$), ilustrado na figura 7D. Quanto aos marcadores inflamatórios, não houve diferença significativa nos níveis circulantes de TNF- α ($p=0,058$) entre os grupos experimentais (Figura 7E). Quanto à IL1- β , seus níveis séricos foram indetectáveis pelo kit utilizado neste estudo.

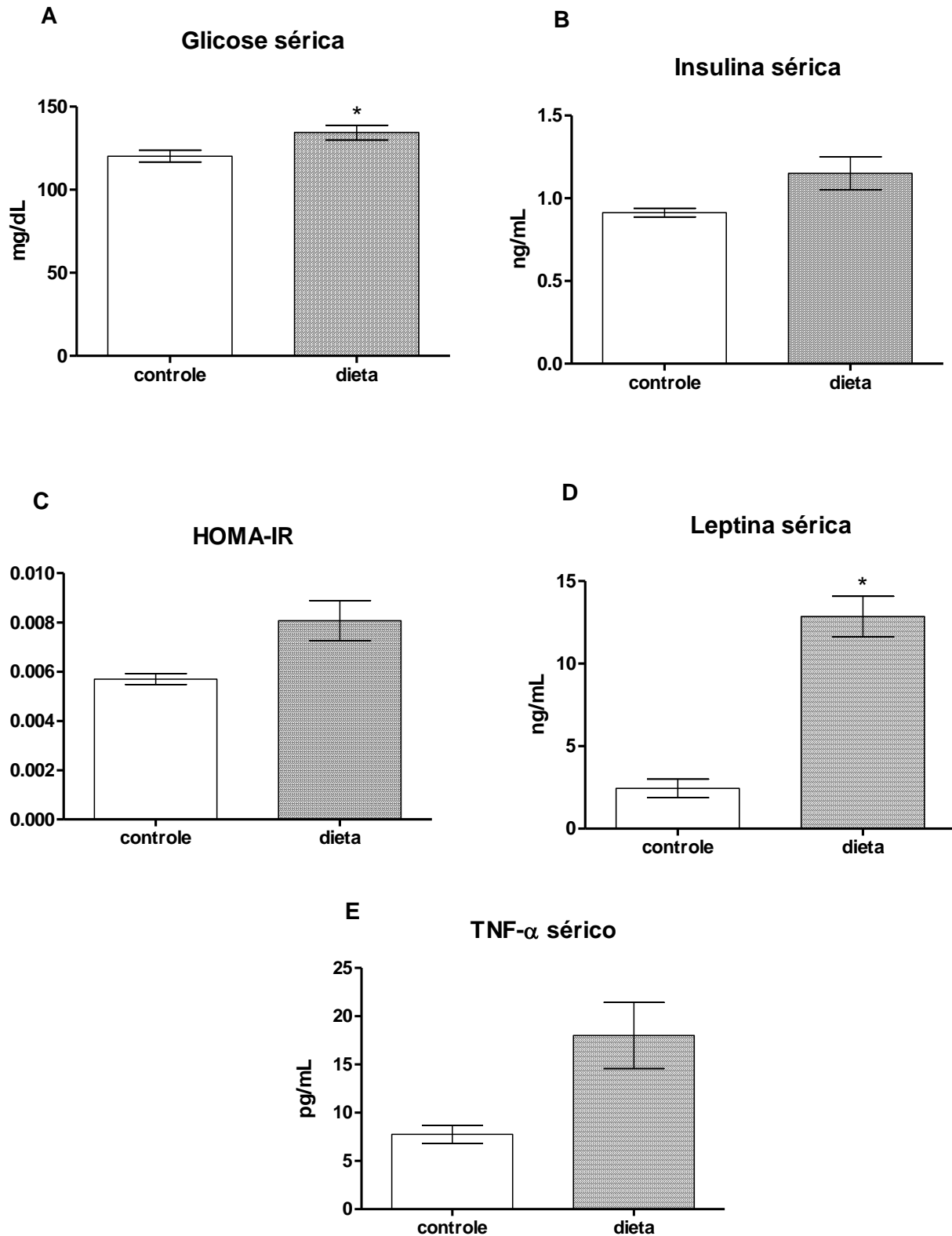


Figura 7. Parâmetros séricos. **A) Glicose sérica:** houve aumento significativo nos animais do grupo dieta ($p=0,036$; $n=9$). **B) Insulina sérica:** não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,123$; $n = 7$ a 8). **C) HOMA-IR:** não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,0766$; $n=7$). **D) Leptina sérica:** houve aumento significativo nos animais do grupo dieta ($p=0,049$; $n = 6$ a 7). **E) TNF- α sérico:** não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,058$; $n=5$).

5.5 Parâmetros centrais

A dieta hipercalórica não foi capaz de provocar alterações na concentração de insulina ($p=0,23$) e na expressão de pAkt/Akt total ($p=0,91$) no hipocampo, ilustrada pelas Figuras 8A e 8B. Quanto aos mediadores inflamatórios, tanto TNF- α quanto IL1- β no hipocampo também não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($p=0,94$ e $p=0,47$, respectivamente), como mostra as Figuras 8C e 8D.

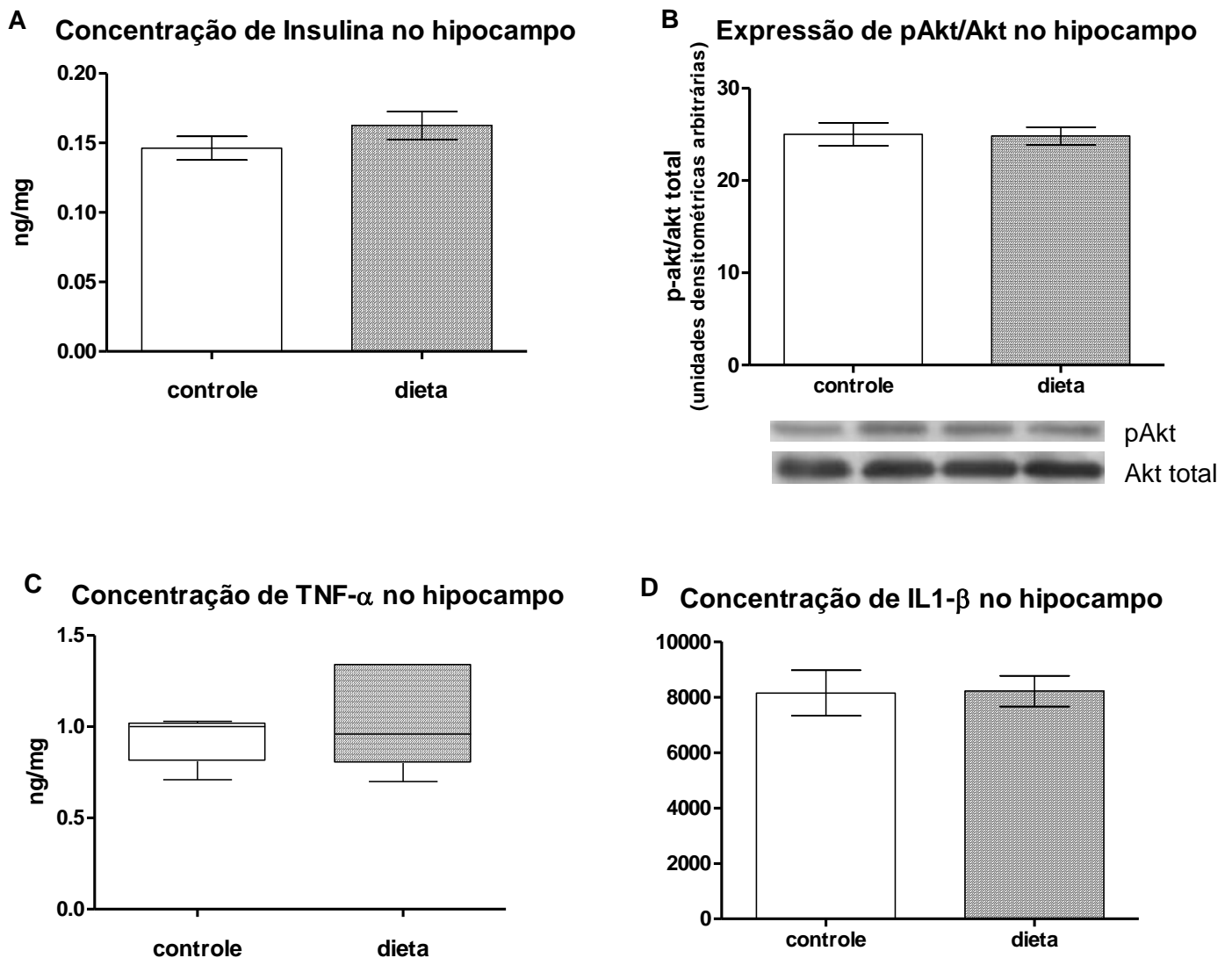


Figura 8. Parâmetros Centrais. **A) Concentração de Insulina no Hipocampo:** não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,23$; $n=8$) **B) Expressão de pAkt/Akt total no hipocampo:** não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,91$; $n=4$). **C) Concentração de TNF- α no Hipocampo:** não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,94$; $n=7$). **D) Concentração de IL1- β no Hipocampo:** não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,47$).

6 Discussão

Este trabalho mostra que os animais do grupo dieta hipercalórica consumiram uma maior quantidade de ração em gramas e em calorias (o que era previsto, uma vez que esta dieta possui alta palatabilidade), resultando no aumento do peso corporal e no aumento do índice lipossomático. Sendo assim, como esperado, esta dieta foi capaz de provocar um quadro de obesidade nesses animais.

Embora não houvesse uma diferença grande na quantidade de calorias oferecidas pela nossa dieta, o tempo de tratamento foi relativamente grande (22 semanas), o que provavelmente foi um fator importante para induzir a diferença no ganho de peso e índice lipossomático encontrados. Zambon *et al.* (2009) submeteram ratos machos a 3 semanas de dieta hipercalórica e não encontraram diferença significativa no peso dos animais, assim como Burneiko *et al.* (2006) quando ofereceram a mesma dieta por 8 semanas. Porém, no estudo de Naderalli *et al.* (2003), o qual ofereceu dieta hipercalórica por 12 semanas, encontram diferença significativa no peso corporal de ratos machos. Diferente da dieta hipercalórica, animais submetidos a uma dieta hiperlipídica ou rica em colesterol por 8 semanas já apresentam diferença significativa no peso corporal (ESTADELA *et al.*, 2004; GUERRA *et al.*, 2007). Animais que foram alimentados com dieta de cafeteria por 15 ou 20 semanas também apresentam aumento de peso em relação aos animais controle (ZEENI *et al.*, 2015; DE SCHEPPER *et al.*, 1998).

Como constatado no teste de reconhecimento de objetos (TRO), os animais que consumiram a dieta hipercalórica não tiveram consolidação de memória, uma vez que gastaram o mesmo tempo explorando os objetos A e C no dia do teste, não reconhecendo o objeto A. Alguns estudos indicam que o peso corporal excessivo e a obesidade podem ser facilitadores e preditores de doenças neurodegenerativas (CAI, 2013a; CAI, 2013b). Jurdak & Kanarek (2009) submeteram ratos machos adultos-jovens a uma dieta rica em açúcar durante 8 semanas e estes exibiram um déficit no desempenho cognitivo no TRO. Em contrapartida, Kosari *et al.*, em 2012, submeteram ratos machos adultos a uma dieta de cafeteria por 13 semanas e não obtiveram diferença significativa neste mesmo teste, bem como Leffa *et al.* em 2015, quando

submeteram ratos machos adultos-jovens a uma dieta rica em gordura e a uma dieta de cafeteria por 12 semanas. Sendo assim, percebe-se que não apenas as calorias, mas a composição da dieta oferecida pode interferir no desempenho cognitivo de roedores.

Na tentativa de explicar o déficit cognitivo apresentado em nosso estudo, parâmetros periféricos e centrais foram analisados. Em relação aos parâmetros periféricos, a dieta provocou um aumento da glicemia, mas não interferiu nos níveis de insulinemia. Quando um indicador de resistência à insulina (HOMA-IR) foi calculado, este apresentou um aumento nos animais do grupo dieta, embora não seja significativo. Como para este indicador não há ponto de corte para animais assim como há para humanos, apenas podemos comparar o valor encontrado entre os grupos. Sendo assim, parece que os animais que consumiram este tipo de dieta podem estar no início do desenvolvimento de resistência à insulina, onde os níveis de glicose estão alterados, mas os de insulina ainda não. Naderalli *et al.* (2001) quando submeteram ratas fêmeas a uma dieta hipercalórica por 12 semanas, não obtiveram diferença significativa nos níveis de glicose e insulina sanguíneas. Porém, quando Nascimento *et al.* (2008) submeteram ratos machos a uma dieta também hipercalórica, mas por duas semanas a mais (isto é, 14 semanas) encontraram aumento de glicose e insulina séricas. Comparando com uma dieta diferente, Barnes *et al.* (2003) submeteram ratos machos a uma dieta hiperlipídica por apenas 12 semanas e já obtiveram aumento nos níveis séricos de glicose e insulina. Como visto nestes estudos, o sexo, o tempo e a composição da dieta são fatores que influenciam no desenvolvimento das alterações de glicose e insulina. Talvez, com uma dieta mais hipercalórica teria sido possível um quadro de resistência à insulina completo, pois entre a dieta padrão e a dieta hipercalórica oferecidas neste trabalho havia pouca diferença de calorias (controle 2,95 kcal/g e dieta 3,44 kcal/g).

Quanto à concentração sérica das citocinas pró-inflamatórias não se observou diferença significativa entre os grupos. Na Figura 7E, que representa a concentração de TNF- α sérico, vê-se que a dieta hipercalórica aumenta os níveis desta citocina, porém essa diferença não é significativa. Além disso, o número de animais utilizado para este teste foi pequeno e é possível que essa diferença pudesse ser significativa se o número de animais analisados fosse maior. Sabe-se que os níveis séricos de citocinas pró-

inflamatórias estão elevados em obesos e que isto contribui para a patogênese da resistência à insulina (ZAHORSKA-MARKIEWICZ et al., 1999; MOLLER et al., 2000). É possível que a ausência de aumento de citocinas pró-inflamatórias também tenha contribuído para não ter sido observada alteração nos níveis de insulina sérica.

Por outro lado, a dieta aumentou a concentração sérica de leptina, do mesmo modo que aumentou o ILS, concordando com outros estudos que indicam que a obesidade estimula o aumento da produção de leptina e que pode resultar em resistência à mesma (GUERRE-MILLO, 2004; MAURY & BRICHARD, 2010; OUCHI *et al.*, 2011). Sabe-se que os níveis normais de leptina estão associados com menores taxas de declínio cognitivo e demência, pois esta é capaz de influenciar a cognição através da modulação da plasticidade sináptica (FARR *et al.*, 2006; HARVEY *et al.*, 2006). Entretanto, é importante ressaltar que obesos tendem a desenvolver resistência à leptina, atenuando sua ação benéfica no SNC (CARO *et al.*, 2006; CONSIDINE et. al., 1996; BANKS, 2004; ARCH *et al.*, 2005). O resultado encontrado aqui sugere que os animais desenvolveram resistência à leptina; sendo assim, a falta do efeito protetor da leptina pode ter contribuído para a alteração de memória observada no presente estudo.

Em relação aos parâmetros centrais, TNF- α , IL1- β e insulina no hipocampo não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Isso indica que aparentemente não houve um quadro de neuroinflamação e, sendo assim, também não houve uma resistência à insulina no hipocampo, seguindo o mesmo raciocínio do acontecido na parte periférica; sabe-se que a neuroinflamação tem papel determinante no desenvolvimento da resistência à insulina e a não alteração de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo pode ter contribuído para não ter sido observada alteração nos níveis hipocampais de insulina. Esses resultados não estão de acordo com o estudo de Puig *et al.* (2012) que mostraram que o aumento da expressão de TNF- α pode ser induzido no hipocampo de animais alimentados com dieta hipercalórica. Apesar do estudo de Puig ter sido realizado pelo mesmo tempo que o presente estudo (22 semanas), a dieta hipercalórica apresentava um maior conteúdo de lipídeos e também uma maior quantidade de calorias em relação à dieta controle. Ademais, foram utilizados ratos machos, ao contrário deste estudo, que utilizou ratas fêmeas.

Além disso, estes parâmetros centrais somente foram analisados em uma estrutura do SNC envolvida com a memória, e desse modo, seria interessante investigar se há alteração de citocinas inflamatórias em outras estruturas envolvidas com o processamento da memória de reconhecimento como, córtex perirrinal, córtex entorrinal e córtex para-hipocampal. Deve-se considerar também, que outras moléculas relacionadas com a neuroinflamação podem estar participando da resposta central a uma dieta hipercalórica, mas estas não foram mensuradas neste estudo, tais como IL-2 e IL-6.

7 Considerações finais

Pode-se concluir que esta dieta hipercalórica foi eficaz para causar obesidade e desencadear uma alteração na memória de reconhecimento de objetos, porém não causou inflamação sistêmica ou hipocampal. É possível que esta dieta não tenha sido hipercalórica o suficiente para desencadear alterações nos parâmetros inflamatórios e na insulina, embora tenha sido capaz de induzir obesidade. Por outro lado, houve aumento dos níveis séricos de leptina nos animais que receberam a dieta hipercalórica, o que indica que poderia haver uma associação do aumento da leptina sérica com a alteração da memória de reconhecimento encontrada nesses animais. Também fica em aberto se em outras estruturas do SNC relacionadas com o processamento de informações e memória, como córtex perirrinal, córtex entorrinal e córtex para-hipocampal, poderia estar havendo alguma alteração indicativa de neuroinflamação ou resistência à insulina, as quais não foram investigadas neste trabalho.

O presente estudo sugere que o consumo de uma dieta hipercalórica pode afetar a memória de fêmeas em uma faixa etária adulto-jovem. Isso mostra que, além da idade avançada, o tipo de alimentação que se consome também é um fator envolvido no desenvolvimento de déficit cognitivo e que tanto machos quanto fêmeas adulto-jovens estão suscetíveis a esta alteração. Entretanto, são necessários outros estudos para que sejam esclarecidos os mecanismos subjacentes a este prejuízo de memória encontrado nos animais alimentados com dieta hipercalórica.

Referências

- AHIMA, R. S. Revisiting leptin's role in obesity and weight loss. **J Clin Invest**, v. 118, p. 2380-3, 2008.
- AKIYAMA, H., BARGER, S., BARNUM, S., BRADT, B., BAUER, J., COLE, G.M., et al. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 21, n. 3, p. 383–421, 2000.
- ARCH, J.R. Central regulation of energy balance: inputs, outputs and leptin resistance. **Proc Nutr Soc**, v. 64, p. 39–46, 2005.
- ARSLAN, N., ERDUR, B., AYDIN, A. Hormones and cytokines in childhood obesity. *Indian Pediatr*, v. 47, n. 10, p. 829-39, 2010.
- ASCASO, J.F., PARDO, S., REAL, J.T., et al. Diagnosing insulin resistance by simple quantitative methods in subjects with normal glucose metabolism. **Diabetes Care**, v. 26, p. 3320-5, 2003.
- BAKER, L.D., CROSS, D.J., MINOSHIMA, S., BELONGIA, D., WATSON, G.S., CRAFT, S. Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with pre diabetes or early type 2 diabetes. **ArchNeurol**, v. 68, n. 1, p. 51–7, 2011.
- BANKS, W.A., COON, A.B., ROBINSON, S.M., MOINUDDIN, A., SHULTZ, J.M., NAKAOKE, R., MORLEY, J.E. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. **Diabetes**, v. 53, p. 1253–1260, 2004.
- BARNES, M.J., LAPANOWSKI, K., CONLEY, A., RAFOLS, J.A., JEN, K.L., DUNBAR, J.C. High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic mu opioid receptors. **Brain Res Bull**, v. 61, n. 5, p. 511-9, 2003.
- BARROS, D., AMARAL, O., IZQUIERDO, I., GERACITANO, L., RASEIRA, M.C.B., HENRIQUES, A.T., RAMIREZ, M.R. Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. **Pharmacol, Biochem and Behav**, v. 84, p. 229–234, 2006.
- BECKER, J.B., ARNOLD, A.P., BERKLEY, K.J., BLAUSTEIN, J.D., ECKEL, L.A., HAMPSON, E., et al. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. **Endocrinology**, v. 146, p. 1650–73, 2005.
- BLÁZQUEZ, E., VELÁZQUEZ, E., HURTADO-CARNEIRO, V., RUIZ-ALBUSAC, J.M. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and alzheimer's disease. **Frontiers in Endocrinology | Neuroendocrine Science**, v. 5, 1n. 161, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Obesidade. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

BROWN, E., UMINO, Y., LOI, T., SOLESSIO, E., BARLOW, R. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. **Visual Neuroscience**, v.22, p.615-618, 2005.

BURNEIKO, R.C., DINIZ, Y.S., GALHARDI, C.M., RODRIGUES, H.G., EBAID, G.M., FAINE, L.A., et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chem Toxicol.**, v. 44, n. 7, p. 1167-72, 2006.

CAI, D. Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition induced diseases. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 1, p. 40–47, 2013.

CAI, D. Neuroinflammation in overnutrition-induced diseases. **Vitamins & Hormones**, v. 91, p. 195–218, 2013.

CARO, J.F., KOLACZYNSKI, J.W., NYCE, M.R., OHANNESIAN, J.P., OPENTANOVA, I., GOLDMAN, W.H., LYNN, R.B., ZHANG, P.L., SINHA, M.K., CONSIDINE, R.V. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. **Lancet**, v. 348, p. 159–161, 1996.

CARVALHEIRA, J.B.C., ZECCHIN, H.G., SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CHAKRABORTY, S., KAUSHIK, D. K., GUPTA, M. & BASU, A. Inflammasome signaling at the heart of central nervous system pathology. **J Neurosci Res**, v 88, p. 1615-3, 2010.

CHEPULIS, L. M., STARKEY N. J., WAAS J.R., MOLAN, P. C. The effects of long-term honey, sucrose or sugar-free diets on memory and anxiety in rats. **Physiology & Behavior**, v. 97, p. 359–368, 2009.

CHIU, S-L., CHEN, C-M., CLINE, H.T. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. **Neuron**, v. 58, p. 708–19, 2008.

CIRILLO, M.A., SEIDMAN, L.J. Verbal declarative memory dysfunction in schizophrenia: from clinical assessment to genetics and brain mechanisms. **Neuropsychol. Rev.**, v.13, p. 43–77, 2003.

CLÀRIA, J., DALLI, J., YACOUBIAN, S., GAO, F., SERHAN, C.N. Resolvin D1 and resolvin D2 govern local inflammatory tone in obese fat. **J Immuno**, v. 189, n. 5, p. 2597-2605, 2012.

CONSIDINE, R.V., SINHA, M.K., HEIMAN, M.L., KRIAUCIUNAS, A., STEPHENS, T.W., NYCE, M.R., OHANNESIAN, J.P., MARCO, C.C., MCKEE, L.J., BAUER, T.L., et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **N Engl J Med**, v. 334, p. 292–295, 1996.

DE SCHEPPER, J.A., SMITZ, J.P., ZHOU, X.L., LOUIS, O., VELKENIERS, B.E., VANHAELST, L. Cafeteria diet-induced obesity is associated with a low spontaneous growth hormone secretion and normal plasma insulin-like growth factor-I concentrations. **Growth Horm IGF Res.**, v.8, n. 5, p. 397-401, 1998.

DERE, E., HUSTON, J.P., SILVA, M.A.S. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. **Neurobiol Learn Mem**, v. 84, p. 214–221, 2005.

DOHERTY, G.H. Obesity and the ageing brain: could leptin play a role in neurodegeneration? **Curr.Gerontol.Geriatr.Res**, v. 708154, 2011.

EICHENBAUM, H., COHEN, N. J. From Conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain. **Oxford Univ. Press**, 2001.

ENNAUCER, A., DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, v. 31, p. 47–59, 1988.

ESTADELLA, D., OYAMA, L.M., DÂMASO, A.R., RIBEIRO, E.B., OLLER, D.O., NASCIMENTO, C.M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition.**, v. 20, n. 2, p. 218-24. 2004.

FADEL, J.R., JOLIVALT, C.G., REAGAN L.P. Food for thought: the role of appetitive peptides in age-related cognitive decline. **Ageing Res. Ver**, v. 12 n. 3, p. 764–776, 2013.

FARR, S.A., BANKS, W.A., MORLEY, J.E. Effects of leptin on memory processing. **Peptides**, v. 27, p. 1420–1425, 2006.

FELICE, F. G., LOURENCO, M. V., FERREIRA, S. T. How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? **Alzheimer's & Dementia**, v.10 p. S26–S32, 2014.

FERGENBAUM, J.H., ET AL. Obesity and lowered cognitive performance in a Canadian First Nations population. **Obesity**, v. 17, p. 1957–1963, 2009.

FLORES-LÁZARO, J.R., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, E., RIVAS-ARANCIBIA, S. Metabolic consequences of the functional alterations of adipose tissue in obese patients. **Rev Med Hosp Gen Méx**, v.74, n. 3, p. 157-165, 2011.

FORSTL, H., KURZ, A. Clinical features of Alzheimer's disease. **Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.**, v. 249, p. 288–290, 1999.

GOLDIM, J.R. Raymundo MM. Pesquisa em saúde e direito dos animais. 2ª edição, 1997, HCPA, Porto Alegre, RS.

GRADY, C.L., FUREY, M.L., PIETRINI, P., HORWITZ, B., RAPOPORT, S.I. Altered brain functional connectivity and impaired short-term memory in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 124, p. 739–756, 2001.

GRILLO, C.A., PIROLI, G.G., EVANS, A.N., MACHT, V.A., WILSON, S.P., SCOTT, K.A., et al. Obesity/hyperleptinemic phenotype adversely affects hippocampal plasticity: effects of dietary restriction. **Physiol. Behav**, v. 104, n. 2, p. 235–241, 2011b.

GRILLO, C.A., PIROLI, G.G., JUNOR, L., WILSON, S.P., MOTT, D.D., WILSON, M.A., REAGAN, L.P. Obesity/ hyperleptinemic phenotype impairs structural and functional plasticity in the rat hippocampus, **Physiol. Behav**, v. 105, n. 1, p. 138–144, 2011a.

GUERRA, R.L., PRADO, W.L., CHEIK, N.C., VIANA, F.P., BOTERO, J.P., VENDRAMINI, R.C., et al. Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats. **Lipids Health Dis.**, v. 2, p. 6-16, 2007.

GUERRE-MILLO, M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. **Diabetes Metab**, v. 30, p. 13-19, 2004.

HARVEY, J., SOLOVYOVA, N., IRVING, A. Leptin and its role in hippocampal synaptic plasticity. **Prog Lipid Res**, v. 45, p. 369–378, 2006.

HEILBRONN, L.K., CAMPBELL, L.V. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. **Curr Ph Rodriguez Arm Des**, v. 14, n. 12, p. 1225-1230, 2008.

HUANG X.F., KOUTCHEROV, I., LIN, S., WANG, H.Q, STORLIEN, L. Localization of leptin receptor mRNA expression in mouse brain. **Neuroreport** v. 7 n. 15–17, p. 2635–2638, 1996.

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011.

IZAOLA, O., LUIS, D., SAJOUX, I., DOMINGO, J.C., VIDAL, M. Inflamación y obesidad (lipoinflamación). **Nutr Hosp**, v. 31, n. 6, p. 2352-2358, 2015.

JANSON, J., LAEDTKE, T., PARISI, J. E., O'BRIEN, P., PETERSEN, R. C., BUTLER, P. C. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. **Diabetes**, v. 53, n. 2, p. 474–81, 2004.

JURDAK, N., KANAREK R. B. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. **Physiology & Behavior**, v. 96, p. 1–5, 2009.

JURDAK, N., LICHTENSTEIN, A. H., KANAREK R. B. Diet-induced obesity and spatial cognition in young male rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 48-54, 2008.

KATSOURI, L., GEORGOPOULOS, S. Lack of LDL receptor enhances Amyloid deposition and decreases glial response in an Alzheimer's disease mouse model. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21880, 2011.

KISHI, T., HIROOKA, Y., NAGAYAMA, T., ISEGAWA, K., KATSUKI, M., TAKESUE, K., SUNAGAWA, K. Calorie restriction improves cognitive decline via up-regulation of brain-derived neurotrophic factor. **Int. Heart J**, v. 56, n. 1, p. 110–115, 2014.

KOSARI, S., BADOER E., NGUYEN, J. C. D., KILLCROSS A. S., JENKINS, T. A. Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 235, p. 98–103, 2012.

LEFFA, D. D., VALVASSORI S. S., VARELA R. B., LOPES-BORGES, J., DAUMANN, F., LONGARETTI, L. M., DAJORI, A. L. F., QUEVEDO, J., ANDRADE, V. M. Effects of palatable cafeteria diet on cognitive and noncognitive behaviors and brain neurotrophins' levels in mice. **Metab Brain Dis**, v. 30, p. 1073–1082, 2015.

LIU, Y., LIU, F., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., GONG, C.X. Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease. **Neurochem**, v. 111, n. 1, p. 242–9, 2009.

LUCHSINGER, J.A., TANG, M.X., SHEA, S., MAYEUX, R. Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. **Neurology**, v. 63, n. 7, p. 1187–92, 2004.

MAURY, E. & BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Mol Cell Endocrinol**, v. 314, p. 1-16, 2010.

MCGREGOR, G., MALEKIZADEH, Y., HARVEY, J. Minireview: food for thought: regulation of synaptic function by metabolic hormones, **Mol. Endocrinol**, v. 29, n 1, p. 3–13, 2015.

MCNAY, E.C., RECKNAGEL, A.K. Brain insulin signaling: a key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes. **Neurobiol Learn Mem**, v. 96, p. 432–42, 2011.

MERCER, J.G., HOGGARD, N., WILLIAMS, L.M., LAWRENCE, C.B., HANNAH, L.T., TRAYHURN, P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS Lett**, v. 387, n. 2, p. 113–116, 1996.

MOLLER, DE. Potential role TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes trends. **Endocrinal Metab**, v 11, p. 212-217, 2000.

MONTAGUE, C. T., PRINS, J. B., SANDERS, L., ZHANG, J., SEWTER, C. P., DIGBY, J., BYRNE, C. D. & O'RAHILLY, S. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. **Diabetes**, v. 47, p. 1384-91, 1998.

NADERALI, E.K., BROWN, M.J., PICKAVANCE, L.C., WILDING, J.P., DOYLE, P.J., WILLIAMS, G. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. **Clin Sci (Lond)**, v. 101, n. 5, p. 499-506, 2001.

NADERALI, E.K., WILLIAMS, G. Prolonged endothelial-dependent and independent arterial dysfunction induced in the rat by short-term feeding with a high-fat, high-sucrose diet. **Atherosclerosis**, v. 166, n. 2, p. 253-9, 2003.

NAHID, A., AZAD, M.D., MUNEERAH, A.I., BUGAMI, M.D., INGE LOY-ENGLISH, M.D. Gender Differences in Dementia Risk Factors. **Gender Medicine**, v. 4, n. 2, 2007.

NASCIMENTO, A.F., SUGIZAKI, M.M., LEOPOLDO, A.S., LIMA-LEOPOLDO, A.P., UVIZOTTO, R.A., NOGUEIRA, C.R., et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in wistar rats. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 6, p. 968-74, 2008.

OOMURA, Y., HORI, N., SHIRAISHI, T., FUKUNAGA, et al. Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMKII phosphorylation in rats. **Peptides**, v. 27, p. 2738–2749, 2006.

OUCHI, N., PARKER, J. L., LUGUS, J. J. & WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, p. 85-97, 2011.

PAUWELS, K., WILLIAMS, T.L., MORRIS, K.L., JONCKHEERE, W., VANDERSTEEN, A., KELLY, G. et al. The structural bases for increased toxicity of pathological L Ab42:Ab40 ratios in Alzheimer's disease. **J Biol Chem**, v. 287, n. 8, p. 5650-5660, 2012.

PEREZ-GONZALEZ, R., ANTEQUERA, D., VARGAS, T., SPUCH, C., BOLOS, M., CARRO, E. Leptin induces proliferation of neuronal progenitors and neuroprotection in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 2, n. 2, p. 17–25, 2011.

- PINKHAM, A.E., GUR, R.E., GUR, R.C. Affect recognition deficits in schizophrenia: neural substrates and psychopharmacological implications. **Expert Rev. Neurother.**, v.7, p. 807–816, 2007.
- PINTANA, H., APAIJAI, N., CHATTIPAKORN, N., & CHATTIPAKORN, S.C. DPP-4 inhibitors improve cognition and brain mitochondrial function of insulin-resistant rats. **J. Endocrinol.**, v. 218, n. 1, p. 1–11, 2013.
- PINTANA, H., APAIJAI, N., PRATCHAYASAKUL, W., CHATTIPAKORN, N., CHATTIPAKORN S.C. Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. **Life Sci**, v. 91 n. 11, p. 409–414, 2012.
- PUIG, K. L., FLODEN, A. M., ADHIKARI, R., GOLOVKO, M. Y. & COMBS, C. K. 2012. Amyloid precursor protein and proinflammatory changes are regulated in brain and adipose tissue in a murine model of high fat diet-induced obesity. *PLoS One*, 7, e30378.
- rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiol**, v. 29, p. 8-12, 2008.
- RODRIGUEZ, R.E., PEREA, J.M., LÓPEZ-SOBALER, A.M., ORTEGA, R.M. Obesity, insulin resistance and increase in adipokines levels: importance of the diet and physical activity. **Nutr Hosp**, v. 24, n. 4, p. 415-421, 2009.
- ROMERO, C. E. M., ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, São Paulo, v.19, n.1, p.85-91, jan./fev. 2006.
- ROSSATO, J.I., BEVILAQUA, L.R.M., MYSKIW, J.C., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I., CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learn Mem**, v. 14, p. 36–46, 2007.
- SAHA JK, XIA J, GRONDIN JM, ENGLE SK, JABUBOWSKI JA. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Exp Biol. Med**, v. 230, n. 10, p. 777-84, 2005.
- SIGNORE, A. P., ZHANG, F., WENG, Z., GAO, Y.Q., CHEN, J. Leptin neuroprotection in the central nervous system: mechanisms and therapeutic potentials. **J. Neurochem**, v.106, p. 1977–1990, 2008.
- SINGLETERY SJ, KIRSCH AJ, WATSON J, KARIM BO, HUSO DL, HURN PD, et al. Lack of correlation of vaginal impedance measurements with hormone levels in the rat. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science/American Association for Laboratory Animal Science**, v. 44, n. 37, 2005.
- SQUIRE, L.R., WIXTED, J.T., CLARK. R.E. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 8, p. 872–883, 2007.

SQUIRE, L.R., ZOLA-MORGAN, S. The medial temporal lobe memory system. **Science**, v. 253, p.1380–1386, 1991.

UYSAL, K.T., WIESBROCK, S.M., MARINO, M.W., HOTAMISLIGIL, G.S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. **Nature**, v. 389, p. 610–614, 1997.

VIGITEL - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico 2013. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/30/Lancamento-Vigitel-28-04-ok.pdf>> Acesso em: 6 de outubro de 2014.

WARREN, S.G., JURASKA, J.M. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. **Behavioral Neuroscience**, v 3, n. 2, p. 259-266, 1997.

WEISS, A.P., HECKERS, S. Neuroimaging of declarative memory in schizophrenia, **Scand. J. Psychol.**, v. 42, p. 239–250, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva: WHO; 1998.

YU, X., ZHENG, J. Polymorphic structures of Alzheimers's b-amyloid Globulomers. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 1-15, 2011.

ZAHORSKA-MARKIEWICZ, B., JANOWSKA, J., OLSZANECKA-GLINIANOWICZ, M., MAJEWSKI, T. Serum concentration of tumor necrosis factor in obese women. **J Endocrinol Invest**, v. 22, p. 66, 1999.

ZAMBON, L., DUARTE, F.O., FREITAS, L.F., SCARMAGNANI, F.R., DÂMASO, A.R., OLIVEIRA-DUARTE, A.C., et al. Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. **Rev Nutr**, v. 22, n. 5, p. 707-15, 2009.

ZEENI, N., DAGHER-HAMALIAN, C., DIMASSI, H., FAOUR, W. H. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. **Inflamm. Res.**, v. 64, p. 501–512, 2015.

ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425-32, 1994.

ZHAO, W., WU, X., XIE, H., KE, Y., YUNGW, H. Permissive role of insulin in the expression of long-term potentiation in the hippocampus of immature rats. **Neurosignals**, v 18, p. 236–45, 2010.