

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE FISIOLÓGIA CARDIOVASCULAR

**Relação entre a obesidade induzida por dieta hiperlipídica e o desenvolvimento de transtornos de ansiedade em ratos *Wistar***

Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de Noronha

Ouro Preto  
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE FISILOGIA CARDIOVASCULAR

**Relação entre a obesidade induzida por dieta hiperlipídica e o desenvolvimento de transtornos de ansiedade em ratos *Wistar***

Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de Noronha

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Orientador: Deoclécio Alves Chianca Júnior

Co-orientador: Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

Ouro Preto

2015

N852r

Noronha, Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de.

Relação entre a obesidade induzida por dieta hiperlipídica e o desenvolvimento de transtornos de ansiedade em ratos Wistar [manuscrito] / Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de Noronha. - 2015.

76f.: il.: grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.

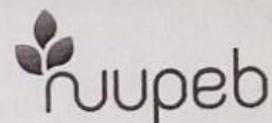
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Obesidade. 2. Ansiedade. 3. Pânico. 4. Comportamento. I. Chianca Júnior, Deoclécio Alves . II. Menezes, Rodrigo Cunha Alvim de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.85:641.56

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



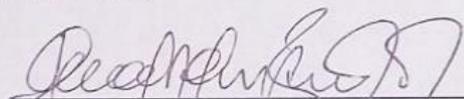
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

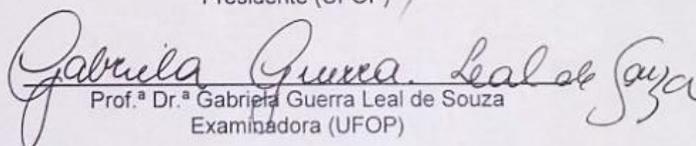
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

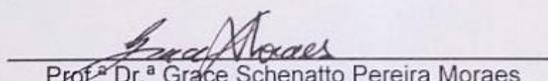
**“Relação entre a obesidade induzida por dieta hiperlipídica e o desenvolvimento de transtornos de ansiedade em ratos *Wistar*”**

Aos vinte e cinco dias do mês de março de 2015, às 13h 30min, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de Noronha**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... **APROVAR** ..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

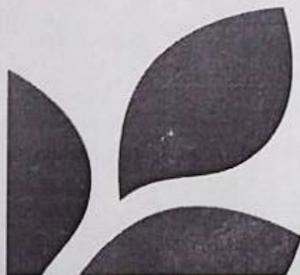
Membros da Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior  
Presidente (UFOP)

  
Prof.ª Dr.ª Gabriela Guerra Leal de Souza  
Examinadora (UFOP)

  
Prof.ª Dr.ª Grace Schenatto Pereira Moraes  
Examinadora (UFMG)

DATA DA DEFESA: 25/03/2015



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB - ICEB II - sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto  
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas** da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio da CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFOP.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Dyrceu José Rendeiro de Noronha (*in memoriam*), que com sua coragem e habilidade genuína de questionar e investigar, inspirou em mim e em minha família (cada um à sua maneira) o constante desejo de aprimorar nosso conhecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente aos meus orientadores, Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes e ao Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr, por permitirem que eu pudesse desenvolver meu mestrado no LFC, por acreditarem que eu seria capaz de desenvolver este trabalho, por todos ensinamentos e discussões e pela enorme paciência comigo;

Aos meus pais, Paula e Dyrceu, por incentivar e apoiar minhas escolhas e por sempre acreditar, mesmo quando eu mesma duvidava, que eu daria conta de finalizar todos os desafios atribuídos a mim, por mais difícil que parecesse;

Aos meus irmãos, Paulo e Labybe, pela amizade, apoio, exemplo de vida, e principalmente pelo privilégio em poder conviver e aprender com vocês;

Ao Luciano, por me apoiar incondicionalmente, pela paciência, companheirismo, carinho, amor, amizade e pela cumplicidade em todos os momentos;

A Aline Rezende, Glenda Viggiano, Aline Arlindo, Laura Batista, Alessandra de Abreu, Fernanda Silva e Luís Henrique que gentilmente me acolheram e permitiram que eu pudesse compartilhar dúvidas, angústias, frustrações, vitórias, conquistas e amizade durante esta caminhada, vocês são especiais;

A todos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, que contribuíram, cada um à sua maneira, para o desenvolvimento deste trabalho, bem como no aprimoramento do conhecimento e experiências científicas;

Aos professores da banca examinadora, Prof. Dr<sup>a</sup> Grace Schenatto e Prof. Dr<sup>a</sup> Gabriela Souza, pela disponibilidade e contribuições a este trabalho;

Aos Laboratórios do NUPEB, e seus professores responsáveis, em especial ao LIMP (Prof.<sup>a</sup> Cláudia Carneiro) e ao LABNEX (Prof. Dr. Marcelo Eustáquio), que não hesitaram em ajudar quando solicitados;

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP (Érika, Lílian e Lorena) pelos animais fornecidos, pelo profissionalismo e compreensão;

Aos colaboradores do LFC Milton de Paula e Marly Lessa, pela convivência, dedicação e disponibilidade em auxiliar e cuidar dos animais;

Enfim, sou grata a todos! Muito obrigada!

“Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z.  
O trabalho é X; Y é o lazer; e Z é manter a boca  
fechada”.

*Albert Einstein*

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
1.1 – A epidemia da obesidade .....	3
1.2 – Obesidade induzida por Dieta Hiperlipídica .....	4
1.3 – Hipotálamo Dorsomedial .....	6
1.4 – Transtornos de Ansiedade.....	10
1.4.1 – Transtorno Generalizado de Ansiedade .....	12
1.4.2 – Transtorno de Pânico.....	12
1.4.3 – Memória.....	13
1.5 – Hipotálamo Dorsomedial e alterações comportamentais .....	13
<b>2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 – Geral .....	16
2.2 – Específicos.....	16
<b>3 – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1 – Modelo Animal.....	17
3.2 – Dietas .....	17
3.3 – Delineamento Experimental.....	18
3.3 – Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DH) .....	19
3.4 – Preparo de drogas e soluções utilizadas .....	19
3.6 – Cirurgia para implante de cânula-guia dirigida no Hipotálamo Dorsomedial .....	21
3.6.1 – Cuidados pós-operatório.....	21
3.7 – Procedimentos de microinjeção.....	22
3.8 – Testes comportamentais .....	22
3.8.1 – Labirinto em T-Elevado (LTE) .....	23
3.8.2 – Teste de atividade locomotora .....	26
3.8.3 – Teste de memória .....	26
3.9 – Procedimentos experimentais .....	27
3.9.1 – Participação da obesidade no comportamento do tipo ansiedade, do tipo pânico, na atividade locomotora e na memória. ....	28
3.9.2 – Participação da inibição química do HDM no comportamento do tipo ansiedade, do tipo pânico, na atividade locomotora e na memória. ....	29
3.9.3 – Participação da ativação química do HDM no comportamento do tipo ansiedade, do tipo pânico, na atividade locomotora e na memória. ....	30
3.10 – Procedimentos histológicos .....	31
3.11 – Análise dos dados .....	31
3.11 – Análises estatísticas .....	31

<b>4 – RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 – Fotomicrografia dos sítios de microinjeção do HDM.....	32
4.2 – Efeitos da DH sobre as alterações na composição de massa gorda de animais induzidos à obesidade.....	32
4.3 – Influência da obesidade induzida por DH nas alterações comportamentais do tipo ansiedade, do tipo pânico, na atividade locomotora e na memória.....	33
4.4 – Efeitos da inibição química do HDM nas alterações comportamentais do tipo ansiedade, do tipo pânico, na atividade locomotora e na memória.....	35
4.4.1 – Grupo Controle Muscimol x Obeso Muscimol .....	35
4.4.2 – Grupo Controle Veículo x Controle Muscimol.....	37
4.4.3 – Grupo Obeso Veículo x Obeso Muscimol.....	38
4.5 – Efeitos da ativação química do HDM nas alterações comportamentais do tipo ansiedade, do tipo pânico, na atividade locomotora e na memória.....	40
4.5.1 – Grupo Controle Veículo x Controle Bicuculina.....	40
4.5.2 – Grupo Controle Bicuculina x Obeso Bicuculina .....	41
4.5.3 – Grupo Obeso Veículo x Obeso Bicuculina .....	43
4.6 – Avaliação da Atividade Locomotora.....	44
<b>5 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>6 – CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Homeostase energética, metabolismo hepático da glicose, sinalização de nutrientes e sinalização mediada pelos adipócitos.....	6
<b>Figura 2.</b> Representação da localização do hipotálamo dorsomedial.....	8
<b>Figura 3.</b> Representação do correto manuseio do rato para habituá-lo ao experimentar.....	23
<b>Figura 4.</b> Labirinto em Cruz Elevado (LCE), composto por dois braços fechados e dois braços abertos e Labirinto em T-Elevado.....	24
<b>Figura 5.</b> Ilustração da arena utilizada para realização do teste de atividade locomotora no Campo Aberto (CA).....	26
<b>Figura 6.</b> Delineamento experimental do protocolo nutricional e cirúrgico.....	28
<b>Figura 7.</b> Protocolo experimental para avaliação das alterações comportamentais em animais induzidos à obesidade por DH na realização de tarefas no LTE, CA e memória.....	28
<b>Figura 8.</b> Protocolo experimental para avaliação das alterações comportamentais após inibição química do HDM por muscimol na realização de tarefas no LTE, CA e memória.....	30
<b>Figura 9.</b> Protocolo experimental para avaliação das alterações comportamentais após desinibição química do HDM por BMI na realização de tarefas no LTE, CA e memória.....	30
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografia dos sítios de microinjeção no HDM. (A) Microinjeção unilateral de BMI no HDM. (B) Microinjeção bilateral de muscimol no HDM.....	32
<b>Figura 11.</b> Latência da esquiva inibitória e fuga de ratos controle e obesos.....	34
<b>Figura 12.</b> Latência da esquiva inibitória e fuga de ratos controle e obeso tratados com o agonista GABA <sub>A</sub> muscimol.....	36
<b>Figura 13.</b> Latência da esquiva inibitória e fuga de ratos controle veículo e muscimol (C-PBS) e (C-MUS).....	37
<b>Figura 14.</b> Latência da esquiva inibitória e fuga de ratos obesos veículo e muscimol (O-PBS) e (O-MUS).....	39
<b>Figura 15.</b> Latência da esquiva inibitória e fuga de ratos controle veículo e bicuculina (C-PBS) e (C-BIC).....	41
<b>Figura 16.</b> Latência da esquiva inibitória e fuga de ratos controle e obeso bicuculina (C-BIC) e (O-BIC).....	42
<b>Figura 17.</b> Latência da esquiva inibitória e fuga em ratos obeso veículo e bicuculina (O-PBS) e (O-BIC).....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição química da dieta hiperlipídica com 45% kcal/g.....	18
<b>Tabela 2.</b> Efeitos da DH sobre as alterações na composição de massa gorda em ratos <i>Wistar</i> após realização do protocolo nutricional de nove semanas.....	33
<b>Tabela 3.</b> Avaliação da atividade locomotora de animais submetidos ao CA.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

BMI	<i>Bicuculine Methiodide</i>
BZD	Benzodiazepínicos
CA	Campo Aberto
C-BIC	Grupo Controle <i>bicuculina</i>
C-MUS	Grupo Controle Muscimol
C-PBS	Grupo Controle Veículo
FC	Frequência Cardíaca
GABA	Ácido gama-amino butírico
GABA <sub>A</sub> R	Receptor de ácido gama-amino butírico
HDM	Hipotálamo Dorsomedial
IA	Índice de Adiposidade
IMC	Índice de Massa Corporal
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LTE	Labirinto e T-Elevado
MUFA	Ácido graxo monoinsaturado
O-BIC	Grupo Obeso <i>Bicuculina</i>
O-MUS	Grupo Obeso Muscimol
O-PBS	Grupo Obeso Veículo
PAM	Pressão Arterial Média
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
PVN	Núcleo Paraventricular Hipotalâmico
SFA	Ácido graxo saturado
SNC	Sistema Nervoso Central
TAB	Tecido Adiposo Branco
TD	Transtorno Depressivo
TGA	Transtorno Generalizado de Ansiedade
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
TOC	Transtorno Obsessivo Compulsivo
TP	Transtorno de Pânico
VMH	Núcleo Ventromedial Hipotalâmico

## RESUMO

As alterações nos padrões alimentares decorrentes do aumento no consumo de gordura satura estão fortemente relacionadas ao avanço da prevalência de obesidade, ganho de peso e acúmulo de tecido adiposo branco visceral (TAB). Estas alterações fisiológicas vem sendo amplamente associadas ao desenvolvimento de psicopatologias que englobam a disfunção cognitiva, estresse psicológico crônico, depressão e transtornos de ansiedade. O processo inflamatório desencadeado pela obesidade em tecidos periféricos atinge também diferentes núcleos do SNC, levando ao desenvolvimento de neuroinflamação de diferentes núcleos, como o hipotalâmico dorsomedial (HDM). Estudos demonstram que o HDM é tônicoamente regulado por projeções excitatórias glutamatérgicas e projeções inibitórias GABAérgicas e que este está intimamente envolvido no controle da reatividade cardiovascular ao estresse emocional, participando também das respostas comportamentais de roedores. O objetivo deste trabalho foi investigar as alterações comportamentais de esquiva inibitória e fuga, em animais induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica (DH; 45% de gordura), por 9 semanas. As alterações comportamentais dos grupos DC e DH foram avaliadas pelo modelo comportamental no Labirinto em T-elevado (LTE), que consiste em expor os animais no braço fechado (3 tentativas), seguida por exposição ao braço aberto (3 tentativas). Estudos associam a esquiva inibitória ao comportamento do tipo ansiedade, e este é analisado com base no tempo que o animal gasta para sair do braço fechado em cada tentativa. A fuga vem sendo associada ao comportamento do tipo pânico, que é analisada com base no tempo que o animal gasta para deixar o braço aberto. Os animais foram tratados com veículo (PBS), muscimol (agonista GABA<sub>A</sub>) e *bicuculina methiodide* (BMI) (antagonista GABA<sub>A</sub>) antes do teste no LTE. Demonstramos que o grupo obeso veículo apresenta comportamento do tipo ansiedade, com aumento na latência de esquiva quando expostos ao braço fechado do LTE, mas não apresentaram comportamento do tipo pânico. O muscimol não foi eficiente em reduzir a latência de esquiva, mas foi capaz de aumentar a latência de fuga no braço aberto, sugerindo um efeito panicolítico desta droga. A BMI não foi capaz de alterar o comportamento de fuga, mas aumentou a latência de esquiva e comprometeu o aprendizado no grupo controle. Este efeito da BMI não foi observado nos animais obesos, reforçando a idéia de que a obesidade induzida por DH compromete o tônus GABAérgico no HDM.

## ABSTRACT

Changes on eating patterns resulting from high consumption of saturated fat are strongly related to the prevalence of obesity and increased visceral white adipose tissue, which is an important risk factor in the development of comorbidities, among them cognitive dysfunction, chronic lack of psychic stress, hypothalamic inflammation, depression and anxiety disorders. Obesity compromises the regulation of brain nuclei, among them, the dorsomedial hypothalamus (DMH). It is known that the HDM is regulated by tonically glutamatergic excitatory projections and inhibitory GABAergic projections, which are involved in the control of cardiovascular reactivity to stress, as well as behavioral regulation and states of anxiety disorders. The aim of this study was to investigate the behavioral changes related to anxiety-like and panic-like disorders in animals fed a high-fat diet for nine weeks that induced-obesity (HFD 45% fat). For this, we evaluated the behavioral pattern of obese and control animals in the Elevated T-Maze (ETM). This test consists of exposing the animals in the enclosed arm (3 trials) followed by exposure to the open arm (3 trials). The anxiety-like behavior are correlated to time latency that the animal spends to withdrawl from the enclosed arm on each trial, and the panic-like behavior is correlated to time latency that animal takes to leave the open arm. The animals were treat with vehicle (PBS), muscimol (GABA<sub>A</sub> agonist) or bicuculline methiodide (GABA<sub>A</sub> antagonist) before the test in ETM. Our results showed that the obese animals (treated with vehicle) have an anxiety-like behavior evidenced by increased time latency in the enclosed arm of the apparatus, when compared to control animals, however, those animals showed no panic-like behavior. We also observed that muscimol was not effective in reducing the anxiety-like behavior, but showed a potential panicolytic action by increasing the time latency spent by animals in the open arm of the ETM. Treatment with BMI was not effective by inducing panic-like behavior in animals. However, the control group was induce to anxiety-like behavior and had impaired learning ability, an effect that was not observe in obese animals treated with BMI when compared to obese vehicle group, which confirms the involvement of GABAergic commitment in HDM of these animals.

## **1 – INTRODUÇÃO**

### ***1.1 – A epidemia da obesidade***

A obesidade foi reconhecida enquanto doença em 1948, pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Desde então, dados demonstram um crescente aumento na prevalência do sobrepeso e da obesidade em diferentes países atingindo níveis epidêmicos, configurando-se como um grave problema de saúde pública. Apesar de historicamente a obesidade ser uma doença que acometia países industrializados, estudos demonstram seu crescimento em todo o mundo, sendo uma das principais causas no aumento de morbidade e mortalidade da população (Mitchell & Shaw, 2014). Em 2010, o excesso de peso e a obesidade causaram cerca de 3,4 milhões de mortes e uma redução de 4% da estimativa de vida da população mundial (Ng e cols., 2014; Park e cols., 2014). Em 2015, são esperados que cerca de 2,3 bilhões dos indivíduos estejam clinicamente definidos com sobrepeso e 700 milhões com obesidade (Park e cols., 2014). No Brasil, em 2013, dados do Ministério da Saúde revelam que 51,0 % da população está acima do peso e destes 17,5% são obesos (Malta e cols., 2014).

O índice de massa corporal (IMC), calculado pela razão do peso em kg/(altura em m)<sup>2</sup>, é o mais utilizado em estudos como indicador da relação entre o aumento da variação no peso dos indivíduos de mesma altura e o ganho de massa gorda, onde o acúmulo excessivo de gordura corporal (IMC > 30kg/m<sup>2</sup>), é capaz de comprometer a saúde em geral (Amri e cols., 2014). No entanto, o uso do IMC como indicador de massa gorda corporal é bastante criticado e já considerado uma ferramenta imperfeita na categorização da obesidade, já que dois indivíduos com o mesmo IMC podem apresentar percentuais de gordura corporal total distintos, o que viabiliza a utilização de outras medidas, como por exemplo, a aferição da circunferência da cintura, que se mostra uma ferramenta eficiente na determinação do acúmulo de gordura visceral (Mitchell & Shaw, 2014).

Na literatura existe um consenso acerca da etiologia multifatorial da obesidade que envolve fatores históricos, ecológicos, políticos, socioeconômicos, psicossociais, biológicos e culturais (Wanderley & Ferreira, 2010). As mudanças nos padrões dietético e no estado nutricional da população nas últimas décadas, onde,

progressivamente os casos de desnutrição diminuem em detrimento a um crescente aumento da prevalência da obesidade, são importantes na caracterização da transição dos padrões alimentares (Pereira-Lancha e cols., 2012).

As mudanças neste padrão e o aumento de massa gorda, estão fortemente relacionadas ao novo perfil de patologias que atingem os indivíduos. Estas alterações geradas pelo consumo de alimentos industrializados afetam diferentes níveis dos sistemas corporais (cardiovascular, respiratório, circulatório, neuronal e outros) e têm em comum a obesidade como principal fator de risco, sendo esta condição capaz de potencializar e favorecer o rápido desenvolvimento de alterações metabólicas e comorbidades, tais como diabetes, hipertensão arterial, doença coronariana, dislipidemia, apneia obstrutiva do sono, esteatose hepática, câncer, disfunção cognitiva, estresse psicológico crônico, inflamação crônica de baixo grau, inflamação hipotalâmica, depressão e transtornos de ansiedade (Mitchell e cols., 2011; Ryan e cols., 2012; Tryon e cols., 2013; Mather e cols., 2009).

### ***1.2 – Obesidade induzida por Dieta Hiperlipídica***

A ingestão excessiva de calorias é a principal causa no aumento de massa gorda e no desenvolvimento da obesidade nos indivíduos (Velloso, 2009). Estudos epidemiológicos em humanos apontam que existe uma relação positiva entre a quantidade de energia ingerida na dieta proveniente de fonte lipídica (densamente rica em calorias), o ganho de peso corporal e a classificação clínica de obesidade da população (Lissner e cols., 2008; Lissner e cols., 1987).

A partir destas observações, estudos em animais demonstraram que as dietas hiperlipídicas (DH) são eficientes em induzir a obesidade (Pereira-Lancha e cols., 2012). A utilização destas dietas em modelos animais teve início na década de 1940, com a utilização de uma mistura semilíquida extremamente rica em lipídios, onde 70% das calorias totais eram provenientes desta fonte (Samuels e cols., 1948). Em geral, as DH contendo mais de 30% do total de calorias de fonte lipídica são capazes de induzir a obesidade e as rações utilizadas em pesquisas variam entre os diferentes laboratórios, sendo a composição de macronutrientes, densidade de energia e suas propriedades sensoriais diferentes entre si (Lai e cols., 2014). No entanto, as DH possuem uma composição lipídica padrão que varia entre 30% e 60% do total de calorias, apresentando diferentes concentrações de ácidos graxos saturados,

monoinsaturados e poliinsaturados, geralmente oriundos de ingredientes tais como, manteiga, banha de porco, óleo de milho, soja, azeite, amendoim, manteiga de cacau e óleo de peixe (Hariri & Thibault, 2010). Em estudo realizado por Abreu e cols., foi demonstrado que a ração hiperlipídica produzida com 45% de calorias totais proveniente de fonte lipídica saturada (banha de porco), foi eficiente em induzir a obesidade, por meio do ganho de peso, aumento da variação do índice de adiposidade, e ainda por promover o aumento dos tecidos brancos adiposos epididimal, retroperitoneal e inguinal (Abreu e cols., 2014).

Recentemente, alguns autores propuseram que a composição dos ácidos graxos presentes na dieta podem desempenhar diferentes funções frente a regulação do peso corporal, no volume e no número de células do tecido adiposo, afetando diretamente o desenvolvimento e a nocividade da obesidade. As diferenças estruturais destes ácidos graxos – comprimento da cadeia carbônica, grau de insaturação e a localização das duplas ligações – parecem afetar o metabolismo relacionados à oxidação e a sua taxa de deposição (Rosini e cols., 2012; Moussavi e cols., 2008).

Estudos realizados em humanos e em animais demonstraram que os ácidos graxos saturados são mais obesogênicos, promovendo um maior aumento do tecido adiposo em um menor período (Kien e cols., 2005; Delany e cols., 2000). Animais alimentados com DH ricas neste tipo de gordura apresentaram uma maior concentração de células adiposas hipertróficas (que são precursoras da hiperplasia deste tecido), demonstrando assim que este tipo de gordura é capaz de gerar uma obesidade mais severa e nociva (Storlien e cols., 2001). Esta capacidade dos ácidos graxos saturados de se acumular faz com que este seja pobremente mobilizado para gerar energia, permanecendo acilado na forma da triacilgliceróis, facilitando seu armazenado nos adipócitos. Em contrapartida, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e monoinsaturados (MUFA) são mais rapidamente utilizados na geração de energia e conseqüentemente menos utilizados como estoque nos adipócitos (Hariri & Thibault, 2010). Neste sentido, observa-se que o conteúdo energético efetivo de uma dieta é maior quando em sua formulação existe uma grande porcentagem de ácidos graxos saturados (SFA), por estes apresentarem uma menor taxa de oxidação associada ao tamanho de sua cadeia carbônica, além disso, estes SFA, ao contrário dos ácidos graxos insaturados (PUFA e MUFA), também diminuem a termogênese e

não são capazes de suprimir a expressão da transcrição de genes lipogênicos (Moussavi e cols., 2008; Hariri & Thibault, 2010).

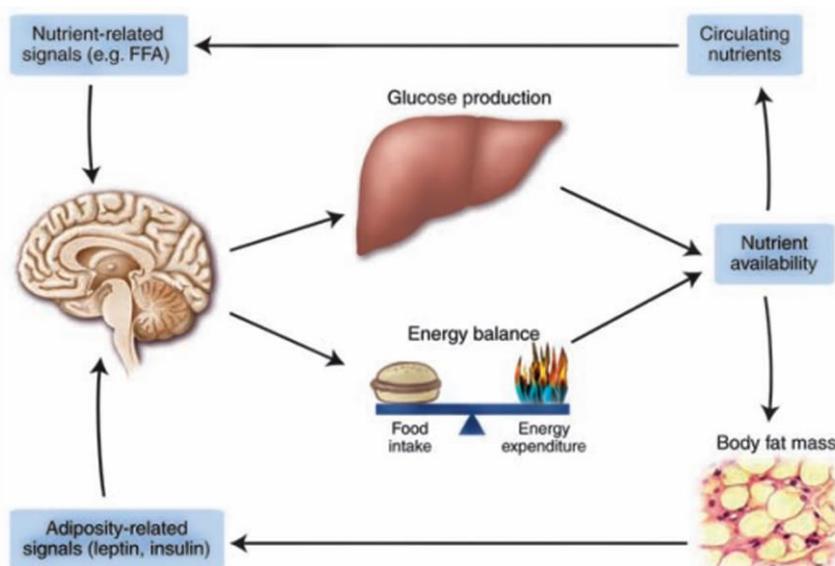
Diante do exposto, o consumo de dietas ricas em gorduras (em especial as SFA), é um dos principais fatores ambientais predisponentes ao desenvolvimento da obesidade, que por sua vez, favorece a reatividade de processos inflamatórios, tanto em tecidos periféricos quanto em importantes regiões encefálicas e núcleos hipotalâmicos, que em resposta as injurias inflamatórias desenvolvem resistência molecular e funcional a hormônios regulatórios, tais como leptina e insulina, provocando alterações na regulação do balanço energético (Milanski e cols., 2009).

### ***1.3 – Hipotálamo Dorsomedial***

A homeostase energética do organismo é rigorosamente regulada pelo sistema nervoso central (SNC) (Schwartz & Porte, Jr., 2005). Diversas evidências indicam que o encéfalo é capaz de processar as informações a partir de sinalizações aferentes iniciadas nos tecidos e órgãos, como por exemplo no tecido adiposo, liberando na circulação hormônios tais como leptina e insulina (proporcionalmente ao total de massa gorda corporal), promovendo a regulação de um importante mecanismo de controle da entrada de nutrientes (glicose e ácidos graxos livres) nas células, como demonstrado na Figura 1 (Schwartz & Porte, Jr., 2005; Suzuki e cols., 2010).

O apetite e a ingestão de alimentos são controlados por conexões neuronais entre o hipotálamo, tronco cerebral e centros corticais. O hipotálamo é tido como o “centro do apetite”, e regula diretamente a percepção de fome, o comportamento relativo à ingestão de alimento e o balanço energético do organismo (Suzuki e cols., 2010; Jauch-Chara & Oltmanns, 2014). A principal hipótese sistêmica sobre esta regulação relaciona-se a sinalização gerada pelos amplos estoques de gordura nos adipócitos e a disponibilidade de nutrientes, que levam à inibição do consumo de energia e da produção endógena de glicose, e simultaneamente à um aumento do gasto de energia com consequente mobilização das reservas de gordura. Em situações responsivas não patológicas o encéfalo detecta se o teor de energia do corpo e a disponibilidade de nutrientes são suficientes, e sistematicamente o organismo armazena o excesso de energia (na forma de massa gorda) e inicia uma resistência ao excesso de nutrientes, tais como glicose (Schwartz & Porte, Jr., 2005).

O hipotálamo é uma estrutura encefálica bem descrita anatomicamente, basicamente composta por três diferentes zonas longitudinais (periventricular, medial e lateral) e dividida por quatro regiões rostro-caudais (preóptica, anterior, tuberal e mamilar). A zona medial do hipotálamo, consiste em uma série de grupos celulares bem definidos, que de acordo com evidências estão fortemente envolvidas nas respostas de comportamento motivado (Canteras, 2002).

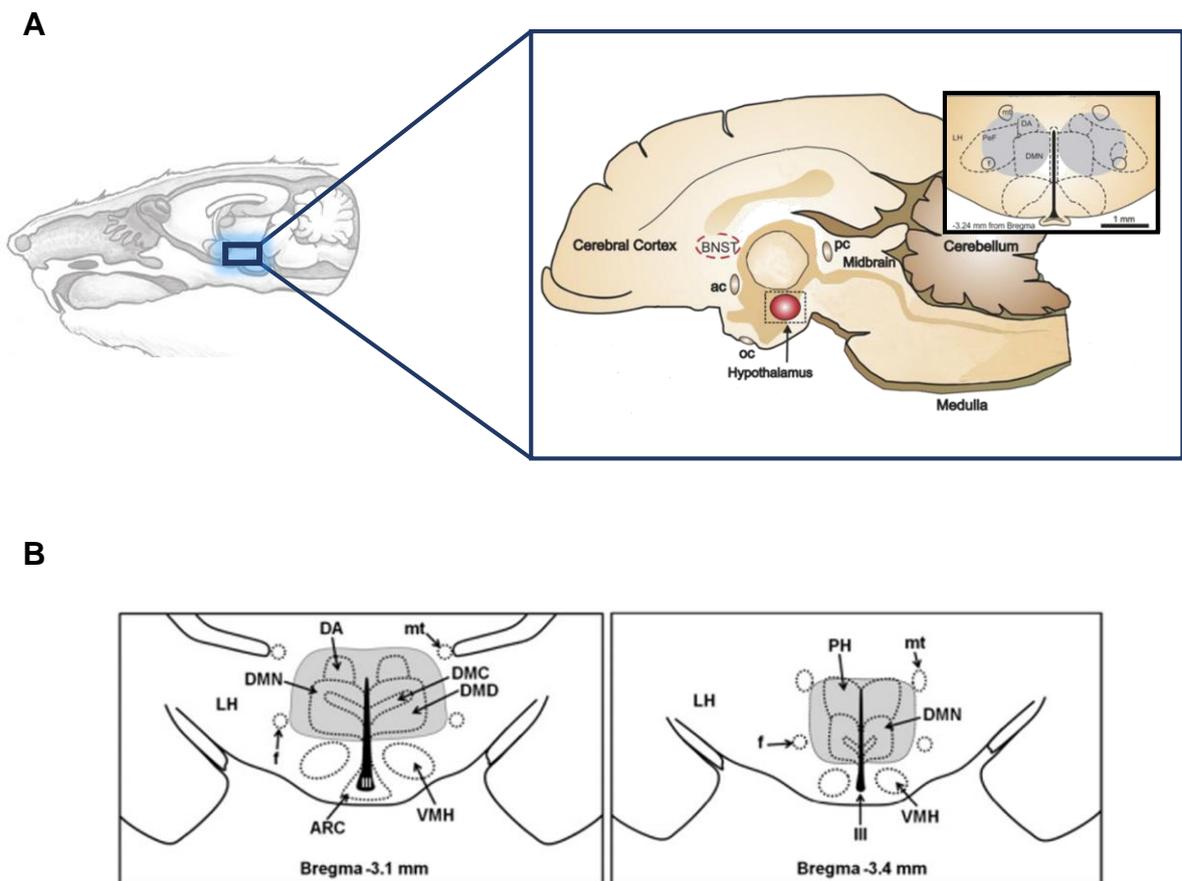


**Figura 1.** Modelo descritivo da homeostase energética, metabolismo hepático da glicose, sinalização de nutrientes e sinalização mediada pelos adipócitos. Os sistemas neuronais, dentre eles o hipotálamo, geram respostas aos estímulos hormonais e ao aporte de nutrientes (Schwartz & Porte, Jr., 2005).

O grupo de células hipotalâmicas objeto de estudo neste trabalho foi o hipotálamo dorsomedial (HDM), que está localizado adjacente ao terceiro ventrículo, caudal e ventral ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), dorsal ao núcleo ventromedial (VMH), ventral à zona incerta. Suas bordas laterais e caudais não são bem distinguidas. Lateralmente, o DMH é circundado pela região perifornical da área hipotalâmica lateral, e seu limite caudal termina no núcleo periventricular posterior (Fontes e cols., 2011) (Figura 2).

Estudos ressaltam a importância do HDM na regulação de diversas respostas fisiológicas, como, reprodução, ingestão de alimentos, modulação endócrina e autonômica, na regulação do ciclo circadiano e termogênese (Zaretskaia e cols.,

2008; Martinez e cols., 2008; Thompson & Swanson, 1998). Outra importante participação deste núcleo se dá em relação ao seu envolvimento nas repostas comportamentais, onde diversas evidências destacam sua participação na reatividade ao estresse emocional, respostas defensivas, integração de respostas inatas, formação de memória ao medo, e nos transtornos de ansiedade (Johnson & Shekhar, 2006; Nascimento e cols., 2010; Bergado-Acosta e cols., 2014).



**Figura 2.** Representação da localização do hipotálamo dorsomedial. (A) Localização diencefálica do hipotálamo de ratos e de corte sagital demonstrando a localização HDM (Johnson & Shekhar, 2012; Sokolowski & Corbin, 2012). Adaptado. (B) Diagrama dos principais núcleos hipotalâmicos. III: terceiro ventrículo; DMN: núcleo hipotalâmico dorsomedial; DMC: porção compacta do núcleo hipotalâmico; DMD: porção difusa do núcleo hipotalâmico; PH: área hipotalâmica posterior; VMH: núcleo hipotalâmico ventromedial; f: fórnix; MT: trato mamilotalâmico; LH: hipotálamo lateral; DA: área hipotalâmica dorsal; ARC: núcleo hipotalâmico arqueado (Fontes e cols., 2011).

O SNC, bem como os núcleos hipotalâmicos são tonicamente regulados pelo ácido  $\alpha$ -amino-butírico (GABA) (Mohler, 2012; Dimicco e cols., 2002). O GABA, que é

gerado a partir do glutamato pela enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD) é o principal neurotransmissor inibitório em mamíferos, e parece desempenhar um papel fundamental na formação das respostas de medo, incluindo sua aquisição, tempo de armazenamento e subsequente modulação. Os neurônios GABAérgicos estão diretamente envolvidos nos circuitos relacionados à resposta de medo durante o estresse emocional/ambiental, e o comprometimento deste mecanismo parece estar envolvido em transtornos de ansiedade, tanto em roedores quanto em humanos (Bergado-Acosta e cols., 2014). O glutamato, que também exerce papel fundamental na regulação tônica dos núcleos hipotalâmicos, é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, e alterações da homeostase deste estão fortemente associadas às fisiopatologias neurodegenerativas (Pocock & Kettenmann, 2007).

Em estudo realizado por Abreu e cols., foi avaliado se as alterações na composição da dieta de ratos poderiam relacionar-se com as alterações neuroendócrinas, e ainda se a obesidade induzida por DH (45% de gordura), seria capaz de comprometer os mecanismos de controle regulatórios da reatividade neuronal mediado pelo HDM nas respostas cardiovasculares frente ao estresse emocional (modelo de estresse por jato de ar comprimido). Neste estudo, a inibição química bilateral do HDM realizada por meio da microinjeção de agonista GABA<sub>A</sub> muscimol, mostrou-se ineficiente em conter o aumento da pressão arterial média (PAM), bem como de sustentar a resposta inicial de redução da frequência cardíaca (FC) em animais obesos. Por outro lado, a desinibição química dos receptores GABA<sub>A</sub> no HDM realizado por meio de microinjeção unilateral do antagonista GABA<sub>A</sub>, *bicuculine methiodide* (BMI), foi eficiente em aumentar a PAM e a FC, no entanto, este aumento foi exacerbado e de curta duração em animais obesos. Neste sentido, observou-se que os animais induzidos à obesidade por DH apresentaram um maior aumento da resposta taquicárdica à BMI, ou seja, estes animais desenvolveram uma maior sensibilidade a resposta excitatória glutamatérgica durante o estresse emocional, sendo este um possível efeito do comprometimento gerado pela obesidade na regulação GABAérgica no HDM destes animais (Abreu e cols., 2014).

O HDM é tido como uma região crítica na regulação e coordenação das respostas autonômicas associadas à excitação emocional, reação de defesa e comportamentos de “luta ou fuga” (Johnson & Shekhar, 2012). Esta região encefálica, quando estimulada, gera aumento da frequência cardíaca, respiratória, e outros sinais

de excitação autonômica, tais como sentimentos de apreensão e medo (Shekhar, 1993). Estudos demonstram que o neurotransmissor inibitório GABA, exerce um importante papel na regulação do centro cardio-estimulatório no HDM, e o bloqueio desta região induz, além de alterações cardiovasculares, respostas comportamentais aversivas de fuga/evasão e aumento da ansiedade experimental no teste de “conflito” (Shekhar e cols., 1990). Em contrapartida, o aumento de GABA e o adequado funcionamento de seus receptores GABA<sub>A</sub>R no HDM, são capazes de reduzir este tipo de aversão, e ainda regular o comportamento do tipo ansiedade (resposta complexa expressa pela apreensão psicológica e excitação fisiológica) no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Estes dados sugerem que os neurônios GABAérgicos no HDM estão envolvidos em uma série de respostas fisiológicas e comportamentais associadas à ansiedade e ao estresse (Shekhar, 1993).

#### **1.4 – Transtornos de Ansiedade**

A ansiedade é um termo genérico que descreve subjetivamente uma grande variedade de diferentes estados mentais, que normalmente surgem em resposta a algum tipo de estresse externo ou interno. Em casos onde ocorre uma resposta em momentos inapropriados, ou onde não há um sentido real de ameaça, e ainda, quando existe uma constante ativação responsiva excitatória injustificada, causando prejuízos ao indivíduo, então, clinicamente estes casos se enquadram em algum provável tipo de transtorno de ansiedade (Terlevic e cols., 2013). As principais estruturas responsáveis pelo processamento e avaliação dos estímulos estressores, e organização adequada de respostas fisiológicas e comportamentais são a amígdala, insula, matéria cinzenta periaquedutal, locus coeruleus e hipotálamo (Etkin, 2010). Os transtornos de ansiedades são formados por uma extensa variedade de patologias neuropsiquiátrica, dentre as quais, recebem destaque o transtorno generalizado de ansiedade (GAD), transtorno compulsivo obsessivo (TOC), transtorno de pânico (TP), transtorno depressivo (TD), estresse agudo e pós-traumático e fobias (Pinheiro e cols., 2007).

Existe um grande interesse em novas pesquisas que utilizem diferentes modelos de ansiedade, que sejam capazes de diferir, estímulos ansiogênicos inatos e aprendidos dos animais, e os efeitos responsivos evocados em função da administração de drogas. Neste sentido, os diferentes tipos de modelos de ansiedade

que vem sendo utilizados atualmente, propõem instigar os diferentes tipos de medos, com diferentes demandas e estímulos dos circuitos neuronais (Silveira e cols., 2001).

A grande maioria de testes de ansiedade são validados apenas por meio de medidas comportamentais, e muitas vezes os comprometimentos fisiológicos decorrentes da ansiedade nem sempre são avaliados. No entanto, para estabelecer uma correlação mais forte entre os comportamentos de ansiedade e as alterações nas respostas fisiológicas ao estresse, é importante o uso de tratamentos que exerçam efeito sobre estes dois parâmetros (Shekhar, 1993). De fato, estudos já demonstraram que a administração de agonistas glutamatérgicos no hipotálamo e de antagonistas GABAérgicos nesta região, são capazes de induzir o comportamento de fuga, reação de defesa e excitação autonômica, semelhantes as respostas presentes em animais que são expostos as ameaças naturais. Ainda neste sentido, Da Silva e cols., observaram os efeitos da ativação dos receptores GABA/Benzodiazepinas (BZD) no hipotálamo ventromedial, em relação ao comportamento de animais submetidos ao teste de ansiedade no Labirinto em T-elevado (aparato que permite mesurar dois diferentes tipos de comportamentos – esquiva inibitória e fuga). O comportamento de esquiva inibitória (ou de evitar algo), mensurada neste teste tem sido associada aos comportamentos do tipo ansiedade generalizada. Em contrapartida o comportamento de fuga (ou tentativa de evasão) tem sido associado ao comportamento do tipo pânico (ataques de pânico). Neste estudo, observou-se que a ativação química do receptor GABA<sub>A</sub>, e do receptor GABA<sub>B</sub> por muscimol e midazolam respectivamente, promoveram uma redução do comportamento do tipo pânico (efeito panicolítico) e uma melhora no comportamento do tipo ansiedade (efeito ansiolítico) (da Silva e cols., 2011).

Diversos estudos sugerem que as anormalidades encefálicas dos neurotransmissores, GABA e glutamato são de extrema relevância na fisiopatologia do desenvolvimento de transtornos de ansiedade (Shekhar e cols., 2006). Evidências demonstram que o aumento nos níveis de GABA no HDM relaciona-se com a diminuição da ansiedade, e contrariamente, o comprometimento da síntese deste neurotransmissor gera um aumento do comportamento de pânico, decorrente do predomínio excitatório da via glutamatérgica nesta região. Este contraste comportamental gerado pelas alterações GABAérgicas, seja por bloqueio e/ou inibição GABA, ou por indução da disfunção do HDM, sugere um envolvimento crítico

deste núcleo na modulação dos comportamentos do tipo ansiedade generalizada e do tipo pânico nos diferentes modelos animais (Freitas e cols., 2009; Shekhar, 1993).

#### **1.4.1 – Transtorno Generalizado de Ansiedade**

O transtorno generalizado de ansiedade (TGA) é o mais prevalente dentre os demais, sendo capaz de comprometer cerca de 5% do tempo total de vida dos indivíduos que apresentam esta patologia, além de gerar um impacto significativo aos sistemas de saúde (Hoffman e cols., 2008). O TGA é caracterizado pela apreensão e preocupação crônica, excessiva e incontrolável sobre os diferentes assuntos e situações, causando sofrimento, incapacidade funcional, agitação, sentimento de limitação, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e perturbação do sono. Estes efeitos levam a uma importante diminuição da produtividade dos indivíduos e causa um decréscimo em sua qualidade de vida. Diferentes modelos cognitivos vêm sendo estudados afim de propor um melhor entendimento no desenvolvimento e manutenção dos estados de TGA (Whooley, 2010; Mochcovitch e cols., 2014).

#### **1.4.2 – Transtorno de Pânico**

O transtorno de pânico (TP) atinge aproximadamente 8% da população, sendo que suas manifestações se dão, geralmente no final da adolescência até por volta dos 30 anos de idade. O TP, é caracterizado por recorrentes ataques súbitos de ansiedade, que resultam em preocupação, medo, e ansiedade de que os ataques ocorram novamente, impactando negativamente a vida do indivíduo. Estudos demonstram que o TP coexiste com os transtornos depressivos, favorecendo assim, uma diminuição da qualidade de vida e deficiência cognitiva funcional (Lee e cols., 2014). Neste transtorno, os indivíduos que são afetados interpretam as sensações corporais, tais como, taquicardia, ondas de calor e tonturas, como indicativo de uma catástrofe iminente, como por exemplo, ter um ataque cardíaco. Estudos que utilizam modelos psicológicos de transtorno de pânico observam que estas interpretações distorcidas servem, principalmente, para manter a doença. Ou seja, esses modelos postulam que, os indivíduos que sofrem de TP, ao interpretar as sensações corporais

automaticamente como sendo uma ameaça, incitam um círculo vicioso que culmina impreterivelmente nos ataques de pânico (Woud e cols., 2014).

### **1.4.3 – Memória**

A percepção ao medo está programada de maneira inata nos animais, e é bem conservada entre as espécies. Mesmo assim, sugere-se que ainda exista um grande potencial de percepção em relação ao aprendizado, tanto em humanos quanto em outras espécies, frente aos perigos iminentes de predadores naturais e ameaças ambientais. Estudos demonstram que de fato existe uma associação da memória do medo e o desenvolvimento dos transtornos de ansiedade. A compreensão dos mecanismos neurobiológicos que estão envolvidos na constituição da memória ao medo por um longo período bem como o seu enfraquecimento são de grande interesse atualmente (Phelps & LeDoux, 2005; Kindt, 2014; Mineka & Zinbarg, 2006). No entanto, o problema dos transtornos de ansiedade não são as memórias inatas e adquiridas ao medo, e sim o medo persistente aos estímulos e contextos já conhecidos, onde não há um perigo real (Kindt, 2014).

### **1.5 – Hipotálamo Dorsomedial e alterações comportamentais**

A constatação de que cada transtorno de ansiedade envolve um conjunto particular de sistemas neurobiológicos, leva a diferentes abordagens, que devem ser aplicadas de forma específica a cada um deles (Pinheiro e cols., 2007).

Os receptores GABA<sub>A</sub> do HDM são responsáveis por regular tanto as respostas cardiovasculares ao estresse, quando as alterações comportamentais nos transtornos de ansiedade (Shekhar, 1993). Vários estudos suportam evidências de que o HDM está intimamente envolvido na organização das reações defensivas em modelos animais (Jardim & Guimaraes, 2001) e que ratos expostos a modelos de ansiedade apresentam um aumento dos níveis de catecolaminas (Sajdyk e cols., 1997), além disso, o bloqueio dos receptores GABA<sub>A</sub>R no HDM provocam um aumento nos níveis de corticosterona e de ACTH plasmáticos (Keim & Shekhar, 1996), a presença de lesões neste núcleo geram efeitos comportamentais ansiolíticos (Inglefield e cols., 1994), e a exposição de animais aos testes comportamentais de ansiedade induzem

a expressão de c-Fos neste núcleo (Beckett e cols., 1997). O HDM está envolvido na modulação direta da neurotransmissão mediada por GABA, e o tratamento com o seu agonista é capaz de controlar a ansiedade, bem como de reduzir os comportamentos aversivos gerados por estimulação elétrica (Silveira & Graeff, 1992)

Em estudo realizado por Shekhar, foi avaliado as diferentes alterações comportamentais de ratos submetidos ao teste no LCE, após a estimulação, e o bloqueio do HDM. Neste estudo, os dados obtidos mostraram que a microinjeção do agonista GABA<sub>A</sub> no HDM de ratos é capaz de diminuir o nível de ansiedade, devido ao fato de que nestes testes os animais gastaram um maior tempo explorando os braços abertos do aparato, e também por entrarem mais vezes neste mesmo braço, permanecendo um menor período de tempo no braço fechado. Em contrapartida, os animais que foram submetidos ao tratamento com antagonistas GABA<sub>A</sub>, BMI e picrotoxina, exploraram durante um menor período os braços abertos do LCE, sugerindo um aumento do comportamento de ansiedade (Shekhar, 1993).

Em estudo conduzido por Nascimento e cols., foram realizados testes para avaliar as reações de defesa e fuga em animais tratados com agonista GABA<sub>A</sub> muscimol no HDM e posteriormente submetidos ao teste no LTE. Observou-se que os animais tiveram o comportamento de fuga prejudicado, o que sugere um efeito ansiolítico/panicolítico desta droga (Nascimento e cols., 2010).

Diversos estudos associam o comprometimento ou o bloqueio do neurotransmissor GABA<sub>A</sub> no HDM de animais ao prejuízo autonômico e respiratório que gera respostas semelhantes às observadas durante ataques de pânico em humanos (Johnson & Shekhar, 2006; Johnson & Shekhar, 2012). Tendo então, o HDM como uma região encefálica que controla as respostas relacionadas aos transtornos de ansiedade, dentre eles o comportamento do tipo pânico, então a disfunção deste núcleo em animais é um provável fator de susceptibilidade de modelos animais ao desenvolvimento deste transtorno, o que é sustentado pelas respostas de excitação fisiológica gerada por infusão de lactato de sódio (NaLac) em animais com comprometimento do HDM, e que apresentam comportamento clínico semelhante aos estudados em humanos com esta patologia (Johnson & Shekhar, 2012).

Neste contexto, estudos farmacológicos e genéticos associaram o déficit do neurotransmissor inibitório GABA no encéfalo de mamíferos ao aumento dos comportamentos do tipo ansiedade (Holm e cols., 2011). Além disso, um grande

número de evidências sugere que exista uma relação positiva entre a obesidade, as alterações de humor e os transtornos de ansiedade (Smits e cols., 2010). Estudos demonstram ainda que, a obesidade induzida por DH provoca um aumento expressivo de citocinas pro-inflamatórias (fator de necrose tumoral – TNF- $\alpha$  e interleucina-IL1 $\beta$ ) no hipotálamo de roedores. Evidências clínicas sugerem que esta inflamação não atinge apenas tecidos periféricos, mas também está associada com o aumento da vulnerabilidade do SNC por estes animais desenvolverem um processo de astrogliose reativa (hipertrofia e hiperplasia das células neuronais – astrócitos e glia) em diferentes núcleos encéfalo, dentre eles o HDM. Esta alteração anatômica das células neuronais promove uma redução do tônus inibitório GABAérgico, além de ser característica de diversas neuropatias, dentre elas o acidente vascular cerebral, a doença de Alzheimer, de lesões na medula espinhal e traumas encefálicos (Buckman e cols., 2013; Ortinski e cols., 2010).

O modelo experimental de obesidade induzida utilizada por Abreu e cols., foi eficiente em demonstrar que os animais obesos apresentaram uma maior reatividade ao estresse emocional (alteração de PAM e FC), possivelmente por um comprometimento GABAérgico no HDM ocasionado pelo consumo da DH (45% de gordura) (Abreu e cols., 2014). Diante do exposto, nosso intuito neste trabalho foi investigar se a obesidade induzida por DH (45% de gordura) compromete a regulação exercida pelo HDM em níveis capazes afetar os comportamentos de esquiva inibitória (relacionado às alterações do tipo ansiedade) e fuga (relacionado às alterações do tipo pânico) de animais testados no Labirinto em T-elevado.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – Geral**

Investigar se a obesidade induzida por dieta hiperlipídica compromete a regulação GABAérgica exercida pelo HDM favorecendo alterações no comportamento de esquiva inibitória (alterações do tipo ansiedade) e fuga (alterações do tipo pânico).

### **2.2 – Específicos**

Validar a eficácia da dieta hiperlipídica na indução da obesidade em ratos por meio da quantificação dos tecidos adiposo epididimal, retroperitoneal e inguinal;

Avaliar se a obesidade é capaz de induzir alterações comportamentais (esquiva inibitória, fuga e memória) por meio do teste comportamental no Labirinto em T-elevado;

Avaliar o efeito da inibição química bilateral do HDM sobre os comportamentos de esquiva inibitória, fuga, atividade locomotora e aquisição da memória;

Avaliar o efeito da desinibição química unilateral do HDM sobre os comportamentos de esquiva inibitória, fuga, atividade locomotora e aquisição da memória;

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 – Modelo Animal**

Neste trabalho foram utilizados 71 ratos *Wistar*, com aproximadamente 100±10g provenientes do Centro de Ciências Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP). Todos os animais foram alojados coletivamente em caixas de acrílico com dimensões de 41x34x17cm (máximo de 4 animais por caixa). Estes animais permaneceram no CCA/UFOP durante nove semanas (relativas ao protocolo nutricional) e após este período foram transferidos para o biotério de manutenção anexo ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. Durante todo o período os animais foram mantidos sob temperatura controlada ( $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), sob um ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso *ad libitum* à água e ração. Todos os animais utilizados e os procedimentos neles aplicados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da UFOP por meio do protocolo CEUA/UFOP nº 2013/33 de acordo com as diretrizes da Lei 11.794 (Lei Arouca), e regulamentados pelo Guia de Uso e Cuidado de Animais de Laboratório do *National Research Council, EUA*.

#### **3.2 – Dietas**

Os animais foram separados em dois grupos dietéticos e alimentados com diferentes rações. Animais controle tiveram livre acesso a ração comercial NUVILAB® (11% kcal/g de lipídio) que apresenta a seguinte composição nutricional: 19,0% de proteína, 56,0% de carboidrato, 3,5% de lipídios, 4,5% de celulose, 5,0% de vitaminas e minerais e um total de calorias equivalente à 378 kcal/100g. Os animais induzidos à obesidade tiveram livre acesso à DH (45% Kcal/g de lipídio), desenvolvida pelo Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, com base na fórmula D12451 do laboratório *Research Diets, Inc.*, sendo o total de calorias da sua composição equivalentes a 481 kcal/100g (Abreu e cols., 2014). A dieta foi produzida pela empresa *PragSoluções Biociências, Comércio & Serviços Ltda.*, de acordo com a composição química e nutricional (Tabela 1) pré-estabelecidas por nosso grupo de pesquisa. Por se tratar de uma formulação perecível a mesma permaneceu armazenada em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) até sua utilização.

**Tabela 1.** Composição química da dieta hiperlipídica com 45% kcal/g

Ingredientes	g/kg	Kcal/
Colina	2,5	0
Mix de Vitaminas (AIN 93) <sup>1</sup>	10,0	0
Mix de Minerais (AIN 93) <sup>2</sup>	35,0	0
Celulose	50,0	0
Maltodextrina	115,0	460,0
Amido	127,5	510,0
Sacarose	200,0	800,0
Caseína	220,0	880,0
Banha	200,0	1800,0
Óleo de Soja	40,0	360,0
Total	1000,0	4810,0

<sup>1</sup>**Mistura de minerais (g/Kg de mistura):** NaCl – 139,3 / KI – 0,79 / MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 57,3 / CaCO<sub>3</sub> – 381,4 / MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O – 4,01 / FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 27,0 / ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,548 / CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O – 0,477 / CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O – 0.023 / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 389,0.

<sup>2</sup>**Mistura de vitaminas (g/Kg de mistura):** Acetato de retinol – 0,6 / Colecalciferol – 0,005 / Ácido p-aminobenzóico – 10,00 / I-Inositol – 10,00 / Niacina – 4,00 / Pantotenato de cálcio – 4,00 / Riboflavina – 0,80/ Tiamina HCl – 0,50 / Piridoxina HCl – 0,50 / Ácido fólico – 0,20 / Biotina – 0,04 / Vitamina B12 – 0,003 / Sacarose – q.s.p. 1000. / Colina – 200,0 / Tocoferol – 6,7.

### **3.3 – Delineamento Experimental**

Neste trabalho foram utilizados seis grupos experimentais, sendo que três grupos foram alimentados com ração comercial NUVILAB<sup>®</sup> (controle), e os outros três grupos foram alimentados com ração hiperlipídica (obeso). Todos os grupos foram submetidos ao protocolo nutricional de nove semanas. Após este período os animais entraram na fase experimental e foram alojados individualmente após procedimento cirúrgico (por aproximadamente 8 dias), e continuaram a receber o mesmo tipo de ração inicialmente utilizada. Estes animais foram classificados de acordo com o protocolo nutricional e também pelo tratamento químico, a saber: controle veículo (C-PBS); obeso veículo (O-PBS); controle muscimol (C-MUS); obeso muscimol (O-MUS); controle bicuculina (C-BIC) e obeso bicuculina (O-BIC).

### **3.3 – Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DH)**

Para determinar a eficácia da indução da obesidade nos animais alimentados com DH (45% de lipídio) quando comparados com os animais alimentados com dieta comercial, mensuramos o peso corporal final (PCF) de todos estes, em seguida realizamos eutanásia por perfusão transcardíaca para dissecação dos tecidos adiposos brancos (TAB), epididimal, retroperitoneal e inguinal. A soma do peso destes três tecidos representa a massa gorda visceral total (MG) os animais, sendo este um dos parâmetros utilizado para avaliar a obesidade neste trabalho. Análises comparativas entre os grupos controle e obeso, por meio do índice de adiposidade (IA; obtido pela fórmula  $MG \times 100 / PCF$ ), e o índice de Lee ( $[\sqrt[3]{PCF(g)} \times CNA(mm)] \times 10$ ) também foram utilizadas (Abreu e cols., 2014).

### **3.4 – Preparo de drogas e soluções utilizadas**

**PBS (salina tamponada com fosfato; pH7,2):** a solução foi preparada a partir da diluição de 8,18g de NaCl P.A (SIGMA-ALDRICH, USA), 1,98g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O P.A. (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH, Brasil) e 0,26g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O P.A. (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH, Brasil) em água ultra-purificada (Milli – Q®) q.s.p. 1000mL. O pH (Sensoglass, Sensores Analíticos – Modelo SC02) da solução foi ajustado para 7,2 com soluções de HCl e NaOH, conforme necessidade. A solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C e 1,0 Kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos, conforme protocolo em vigor no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular.

**Anestésico (Solução de Cetamina + Xilazina):** preparado por meio de adição de 3mL de Xilazina (Dopaser - Solução Injetável; Laboratórios Caller AS, Barcelona/Espanha) 3% (p/v) a 10mL de Cetamina (Cloridrato de Cetamina 10%; Syntec do Brasil Ltda, Fabricante: Rhobifarma Industria Farmacêutica Ltda, Hortolândia/São Paulo) 10% (p/v). Utilizada da seguinte forma: dose (Cetamina: 80mg/kg; Xilazina: 7mg/kg) e volume (0,1mL/100g de animal; *i.m.*).

**Anestésico Local – Cloridrato de Lidocaína 2%:** no momento da utilização, diluímos 0,1mL do Cloridrato de Lidocaína 2% (Rhobifarma Indústria Farmacêutica LTDA, Hortolândia/São Paulo) em 0,2mL de PBS.

**Antibiótico (Pentabiótico Veterinário):** (Fortecilin Pequeno Porte, Penicilinas + Estreptomina – Laboratório Bio-Vet S/A) utilizado na prevenção de infecções no

pósoperatório, na dose equivalente a 48.000UI de penicilina, 20mg de estreptomicina e 20mg de diidroestreptomicina/kg. Volume injetado: 0,1 mL/100g de animal; *i.m.*

**Antiinflamatório [Ketoflex 1% p/v (Cetoprofeno)]:** (Ketoflex 1%, Antiinflamatório à base de Cetoprofeno - Mundo Animal Veterinário Ltda.) utilizado com o objetivo de reduzir inflamação e dor decorrente dos procedimentos cirúrgicos. Utilizado na seguinte forma: dose (4mg/Kg) e volume (0,1 mL/100g de animal; *i.m.*).

**Muscimol (agonista dos receptores GABA<sub>A</sub>):** (SIGMA-ALDRICH, USA) diluído em PBS até a concentração utilizada (100pmol/100nL), separado em alíquotas de 10 µL e mantido congelado a -20°C (de Menezes e cols., 2006; de Menezes e cols., 2008).

**Bicuculina methiodide – BMI (antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub>):** (SIGMA-ALDRICH, USA) diluído em PBS até a concentração utilizada (10pmol/100nL), separado em alíquotas de 10µL e mantido congelado a -20°C (Dimicco e cols., 2006).

**Solução paraformaldeído 0,1M a 4%:** solução preparada a partir do aquecimento, sob agitação, de 40g de paraformaldeído em pó (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH, Brasil), duas ou três gotas de NaOH 1M, 500 mL de PB 0,1M e água destilada até que fosse atingido o volume final de 1000mL. Verificou-se se o pH (Sensoglass, Sensores Analíticos – Modelo SC02) da solução estava entre 7,0 e 8,0.

**Solução de gelatina:** preparada a partir da diluição de 5g de gelatina de pele bovina tipo B (SIGMA – ALDRICH, Brasil) em 500mL de água destilada sob aquecimento. Após completa dissolução a mesma foi mantida na geladeira a 4°C para gelatinização das lâminas histológicas.

### **3.5 – Confeção dos materiais utilizados**

**Confeção de cânulas guia (CG):** as CG foram confeccionadas utilizando-se agulha 23G ajustadas, por técnica de eletrocorrosão, até atingirem 15mm. A CG foi encaixada à um suporte preso ao equipamento estereotáxico (StoeltingCo. Illinois, EUA).

**Confeção de cânulas injetoras:** as cânulas injetoras foram confeccionadas a partir de agulha gengival 30G e ajustadas a 16mm para microinjeção no HDM, por técnica de eletrocorrosão. Assim, no momento da microinjeção, a extremidade da cânula injetora permaneceria abaixo da CG, correspondendo à exata localização do DMH, de acordo com as coordenadas utilizadas.

### **3.6 – Cirurgia para implante de cânula-guia dirigida no Hipotálamo Dorsomedial**

Com o auxílio de um aparelho estereotáxico, as CG de 15mm foram implantadas bilateralmente em direção ao HDM. Previamente ao procedimento os animais foram anestesiados com solução de Ketamina e Xilazina (*i.m.*), acomodados e fixados ao estereotáxico com a barra incisiva a 3.3mm abaixo da linha interaural e tricotomizados na região entre os pavilhões auditivos e os olhos. A assepsia desta região foi realizada com PVPI degermante previamente à injeção subcutânea de cloridrato de lidocaína 2% associado à epinefrina (promove vasoconstrição local). A região superior do crânio foi exposta a partir de uma incisão mediana, viabilizando a abertura de dois orifícios que tinham como finalidade fixar parafusos de aço inoxidável, utilizados como pontos de ancoragem das CG. A torre do estereotáxico foi angulada em zero e as CG posicionadas de acordo com as coordenadas estereotáxicas estabelecidas segundo o Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e cols., 1985) utilizando o bregma como referência. Para o HDM: 3.3mm posterior, 0.6mm lateral e 7.6mm ventral. Na sequência, os orifícios para o implante das CG foram feitos e, após a introdução das CG a abertura cirúrgica foi fechada com resina odontológica (acrílico dental polimerizável). Com o intuito de evitar a obstrução das CG por resíduos de sangue ou sujeira, foi utilizado um oclisor de aço inoxidável (15mm). Ao final da cirurgia os animais foram submetidos a cuidados pós-operatórios e passaram por um período de recuperação entre seis e oito dias.

#### **3.6.1 – Cuidados pós-operatório**

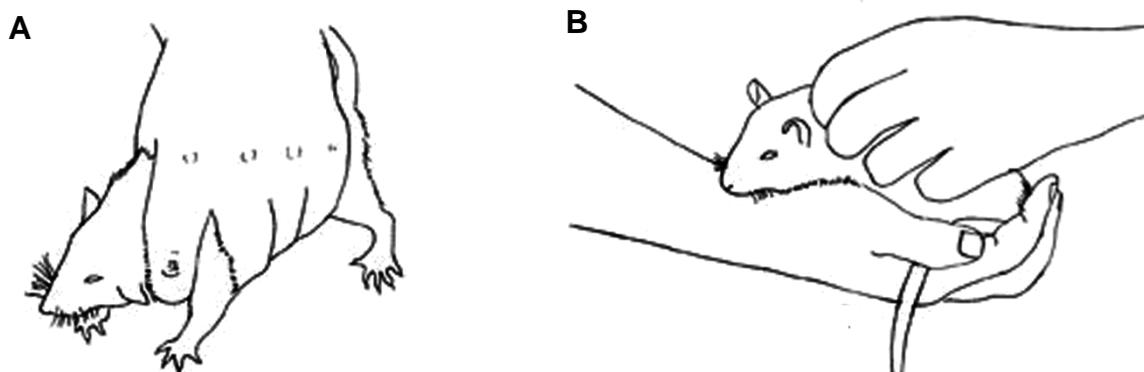
Após o término do procedimento cirúrgico, os animais receberam injeção *i.m.* de cetoprofeno (Ketoflex<sup>®</sup>) e uma dose de antibiótico (Pentabiótico veterinário), para prevenção de inflamação e infecção. Os ratos foram alojados em gaiolas individuais e mantidos sobre manta térmica, a fim de evitar hipotermia, até o final do efeito anestésico. Posteriormente, os animais foram mantidos na sala de experimentos sob condições controladas de temperatura, luminosidade e níveis de ruído, com comida e água *ad libitum*, de acordo com o protocolo nutricional pré-estabelecido.

### 3.7 – Procedimentos de microinjeção

Para realização da microinjeção de veículo (PBS), muscimol ou bicuculina (BMI), as cânulas injetoras foram conectadas a um pequeno tubo de polietileno (Norton, 0,010) e a uma seringa Hamilton de 10 $\mu$ L preenchida com água deionizada. O tubo foi preenchido com a substância (PBS, muscimol ou BMI) a ser microinjetada, e entre tal substância e a água deionizada formou-se uma pequena bolha de ar. Durante a administração, cujo conteúdo total era equivalente a 100nL, o movimento descendente da bolha de ar indicou o sucesso da microinjeção. Após a retirada da cânula injetora a mesma foi testada para verificar possíveis obstruções.

### 3.8 – Testes comportamentais

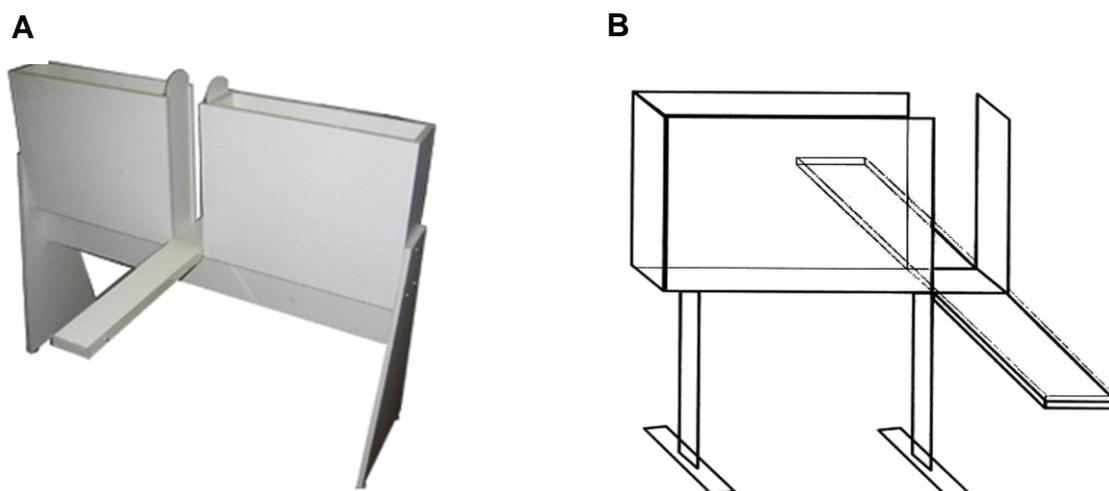
Para realização do teste de memória e avaliação da atividade locomotora, todos os animais foram previamente submetidos ao procedimento cirúrgico para implante da cânula guia no HDM. Após o período de recuperação, os animais foram manuseados pelo experimentador durante dois dias consecutivos, uma vez ao dia, por 5 minutos (Figura 3). Os testes foram realizados em uma sala com controle de luminosidade (60lux) e ruído (Sergio e cols., 2014; Silva e cols., 2014). Todos os animais receberam tratamento de forma randômica com veículo (PBS), muscimol e/ou BMI.



**Figura 3.** Representação de como manusear o rato durante o período de habituação ao experimentador. (A). Ilustra como o animal deve ser segurado para que o mesmo não morda ou escape do experimentador. (B). Ilustra como o animal deve ser acalmado para que o mesmo não entenda a manipulação como um risco. Adaptado. (Handling & Restraint of rats, mice and guinea pigs).

### **3.8.1 – Labirinto em T-Elevado (LTE)**

O Labirinto em T-Elevado (LTE) é uma derivação do Labirinto em Cruz (LCE), já extensivamente utilizado como modelo de teste para avaliar a ansiedade (Handley & Mithani, 1984). O LCE (Figura 4A) é um aparato constituído por dois braços fechados com laterais altas perpendiculares a dois braços abertos, não circundados por paredes, todo o aparato encontra-se elevado 50cm em relação ao chão. O teste no LCE utiliza-se da premissa de que animais (tais como os roedores) possuem medo inato à altura e à locais abertos, onde estes não conseguem realizar com eficiência a exploração tigmotáxica do ambiente por meio de suas vibrissas (Treit e cols., 1993). O modelo comportamental utilizado neste trabalho para investigar alterações na esquiva inibitória e fuga de ratos foi o LTE (Labirinto em T-elevado; previamente padronizado por Graeff, 1994). O LTE foi obtido por meio da exclusão e/ou selagem de uma das entradas aos braços fechado do LCE, resultando assim em um aparato composto por três braços de iguais dimensões (50cm de comprimento x 12cm de largura). Assim como descrito no LCE, no LTE o braço fechado é circundado por uma parede de 40cm de altura e encontra-se perpendicular a dois braços abertos, que possuem apenas uma moldura acrílica de 1cm de altura em sua borda (importante recurso que evita quedas dos animais durante as exposições), e todo o aparato encontra-se elevado 50cm do chão (Figura 4B). Este modelo foi desenvolvido para acessar dois diferentes tipos de comportamentos, esquiva e fuga, que vem sendo relacionados à ansiedade e ao pânico respectivamente. O teste foi descrito da seguinte maneira: quando o animal é colocado na extremidade distal do braço fechado, em relação ao eixo central, ele perde alcance e capacidade visual de ver além das paredes que o circundam, ou seja, o animal não é capaz de ver os braços abertos, a menos que se direcione até a plataforma central e explore o aparato além destas paredes. Em contrapartida, quando o animal é exposto ao braço aberto, ele tem ampla visibilidade (Graeff e cols., 1998).



**Figura 4.** (A) Labirinto em Cruz Elevado (LCE), composto por dois braços fechados e dois braços aberto (50cm x 12cm), suspenso 50cm do chão. Aparato utilizado em testes comportamentais para avaliar modelos de ansiedade. Permite adaptação para ser utilizado na forma do Labirinto em T-Elevado (Insight®). (B) Representação do Labirinto em T-Elevado desenvolvido para avaliar comportamentos de esquila inibitório e fuga em modelos animais de ansiedade e pânico (Jardim e cols., 1999).

Diversos estudos demonstraram que o rato possui uma aversão inata a locais sem proteção e abertos, e neste sentido os braços abertos do LTE simulam um ambiente aversivo que remete a este contexto, tornando os braços abertos do LTE um local extremamente desagradável. Quando o animal é repetidamente colocado no braço fechado ele é capaz de aprender um tipo de comportamento de aversão a exploração e/ou saída do braço fechado, descrito como um comportamento de esquila inibitória. Com este aprendizado o tempo gasto pelo animal (latência) ao longo das tentativas tende a aumentar, ou seja, a exploração (saída do braço fechado) no aparato diminui ou cessa por completo. Por outro lado, quando o animal é colocado na extremidade distal de um dos braços abertos, a tendência é que ele se desloque rapidamente para dentro do braço fechado, local que lhe garante uma sensação de segurança. Os animais não apresentam no comportamento de fuga um perfil tão característico e direto com a capacidade de aprendizado, como ocorre na esquila inibitória, possivelmente por este tipo de comportamento (fuga) relacionar-se fortemente à uma aversão intrínseca (ou inata) de determinadas espécies de animais (Graeff e cols., 1998; Zangrossi, Jr. & Graeff, 1997; Zangrossi, Jr. & Graeff, 2014).

O teste padrão no LTE é realizado a partir de três exposições (tentativas) consecutivas ao braço fechado, seguida por três exposições (tentativas) ao braço

aberto do aparato. Inicialmente o animal é colocado na extremidade distal do braço fechado, e a latência em cada tentativa para explorar o LTE, e ultrapassar o limite proximal da plataforma central com as quatro patas são cronometrados. As tentativas são separadas por meio de curtos intervalos de 30 segundos, e cada uma delas possui como tempo limite 300 segundos. Caso o animal permaneça no mesmo braço durante uma tentativa (300 segundos), a exposição é interrompida e o animal é gentilmente retirado do aparato e recolocado em sua caixa para o intervalo de 30 segundos. Um aumento na latência durante as exposições do animal ao braço fechado no LTE pode estar relacionado com a capacidade de aprender a evitar o perigo, o que vem sendo positivamente associado a um comportamento mais ansiogênico, ou do tipo ansiedade (Pobbe e cols., 2014).

Para acessar o comportamento do tipo pânico, que também pode ser avaliado no LTE, após 30s da realização das três tentativas da esquivia inibitória, o mesmo animal deverá realizar também três tentativas de fuga, para tal o mesmo deverá ser exposto à extremidade distal de um dos braços abertos, usualmente no mesmo braço ao qual este animal foi previamente exposto há 24 horas. Da mesma forma como realizado na esquivia inibitória, a latência gasta pelo animal para fugir do braço aberto ultrapassando a extremidade proximal da plataforma central com as quatro patas é cronometrado, e o limite máximo de latência para cada tentativa também é de 300s.

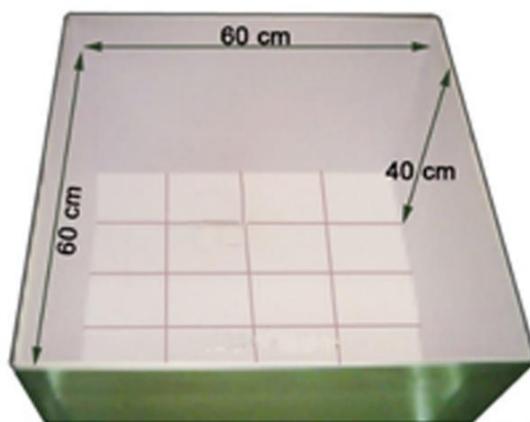
Estudos demonstraram que a exposição prévia (24 horas antes da realização padrão do teste no LTE) dos animais ao braço aberto, por 30 minutos, é capaz de incitar e potencializar a reação ao comportamento de fuga, por reduzir o comportamento exploratório relacionado a novidade, sendo um importante fato na exequibilidade do teste por promover uma diminuição na latência durante o comportamento de fuga dos animais.

O LTE também gera dados acerca do desempenho relacionado a atividade locomotora dos animais quando realizam diferentes tarefas, o que serve de controle para os efeitos não específicos dos diferentes tipos de abordagens pesquisadas (ex.: drogas, lesões encefálicas, manipulações genéticas, dentre outras), e sua relação e/ou influência na atividade motora. Entretanto, quando é observado uma semelhança nas variações relativas aos comportamentos de esquivia inibitória e a fuga, faz-se necessário o uso de um aparato para avaliação independente desta atividade

locomotora, como as obtidas por meio do uso de uma arena, ou campo aberto (Sergio e cols., 2014; Zangrossi, Jr. & Graeff, 2014).

### **3.8.2 – Teste de atividade locomotora**

O teste comumente utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais é o Campo Aberto (CA; Figura 5). A análise aplicada ao CA relaciona-se ao número de vezes que o animal cruza os segmentos (linhas) da arena, possibilitando a mensuração de quantos quadrantes foram percorridos em um tempo máximo de 300 segundos. A utilização deste teste otimiza o processo de comparação entre a atividade locomotora (quadrantes percorridos) e os possíveis efeitos colaterais gerados pela administração de diferentes fármacos nos reflexos locomotores. A realização do teste no CA, por si só, é eficiente em avaliar alterações comportamentais, sendo amplamente utilizado na investigação das alterações do tipo ansiedade. No entanto para estimar-se alterações na atividade locomotora ele é usualmente realizado após algum teste comportamental, e neste caso em específico, após a realização do LTE. Os animais foram expostos ao CA para livre exploração, por um tempo máximo de 300 segundos (Sergio e cols., 2014).



**Figura 5.** Ilustração de uma arena utilizada para realização do teste de atividade locomotora no Campo Aberto (CA) em animais submetidos aos diferentes tratamentos químicos.

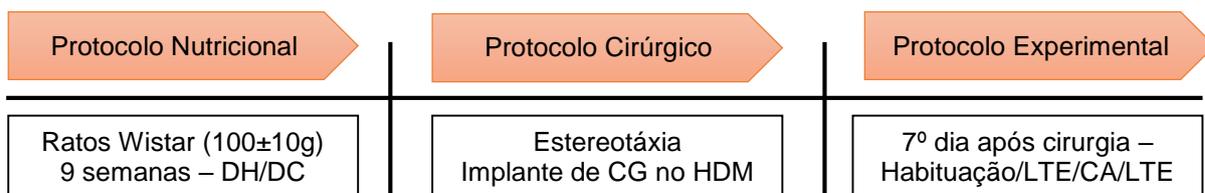
### **3.8.3 – Teste de memória**

Para investigar se as alterações comportamentais de esquiva e fuga sofrem interferência dos tratamentos nutricionais e químicos, alterando inclusive a aquisição

da memória relativa a estes comportamentos, foi realizado uma reexposição após 24 horas dos animais no LTE. Este aparato, apesar de não ser o modelo clássico de avaliação da memória, permite determinar se o estímulo aversivo gerado durante as tentativas no teste padrão no LTE relaciona-se com a aquisição da memória (Sanson & Carobrez, 1999). Nesta nova repetição, os mesmos animais realizaram uma única tentativa de esquiva inibitória (exposição na extremidade distas do braço fechado), e após intervalo de 30s realizaram uma única tentativa de fuga (exposição na extremidade dista do braço aberto). Da mesma forma que no teste padrão, os animais tiveram um limite máximo de tempo para realiza as tarefas de 300s. Todo o experimento foi cronometrado para posterior análise.

### **3.9 – Procedimentos experimentais**

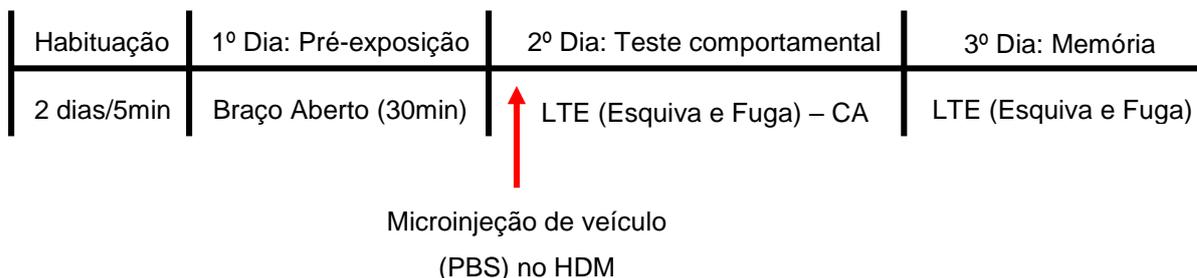
Todos os animais foram submetidos ao mesmo delineamento experimental já descrito. Conforme demonstrado na Figura 5, após nove semanas de protocolo nutricional, os animais foram submetidos à cirurgia para implante das CG (estereotaxia). Após o período de recuperação (7 dias), os animais foram habituados ao manipulador uma vez ao dia, durante dois dias consecutivos por 5 minutos (Figura 3). Após 24 horas do período de manuseio dos ratos, estes foram submetidos ao 1º dia de experimento, que consistia em sua pré-exposição a um dos braços abertos do LTE. Após esta etapa, os animais foram gentilmente recolocados em suas caixas e os oclusores de aço inoxidável das CG foram removidos. No 2º dia de experimento os animais foram submetidos ao teste padrão no LTE para avaliação comportamental. Imediatamente após o termino do teste no LTE, os mesmos animais foram colocados no CA para avaliação da atividade locomotora. No 3º dia, os animais foram reexpostos ao LTE, e em seguida eutanasiados. Após o final de cada etapa, o aparato foi adequadamente higienizado com álcool 20%.



**Figura 6.** Delineamento experimental. Protocolo nutricional, cirúrgico e experimental. DH = Dieta Hiperlipídica; DC = Dieta Controle; CG = Cânula Guia; HDM = Hipotálamo Dorsomedial; LTE = Labirinto em T-Elevado e CA = Campo Aberto.

### 3.9.1 – Participação da obesidade no comportamento do tipo ansiedade e pânico, atividade locomotora e aquisição da memória.

Com o intuito de investigar qual a influência da obesidade induzida por DH nas alterações comportamentais dos animais, o seguinte protocolo experimental foi realizado (Figura 6).



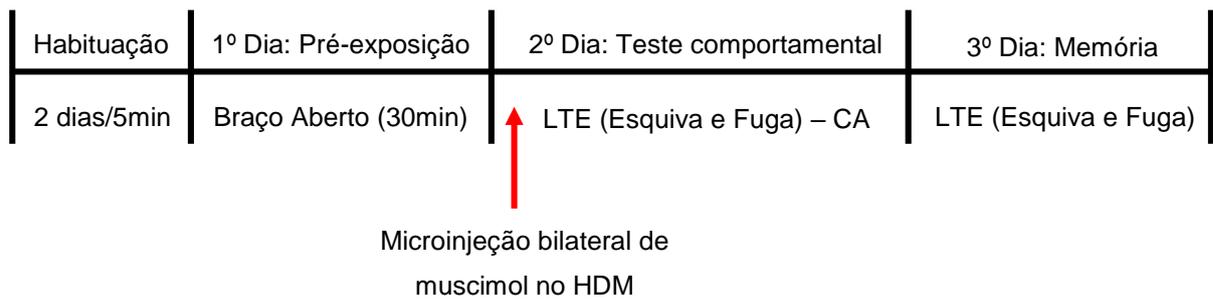
**Figura 7.** Escala temporal do protocolo experimental para avaliação da influência da obesidade induzida por DH na realização do teste comportamental no LTE, atividade locomotora (CA) e memória (LTE), após microinjeção de veículo (PBS/100nL) no HDM.

Após a realização dos protocolos nutricional e cirúrgico, os animais foram submetidos ao protocolo experimental com o intuito de investigar qual a influência da obesidade induzida por DH nas alterações comportamentais. Durante dois dias os animais foram habituados ao manipulador uma vez ao dia por um período de cinco minutos. No 1º dia os animais foram transferidos para a sala experimental (com controle de luz e ruído) e após 30 minutos de ambientação, estes foram pré-expostos randomicamente a um dos braços abertos do LTE por 30 minutos. No 2º dia os animais foram novamente transferidos para a sala de experimentação, e após 30 minutos, receberam a microinjeção de veículo (PBS) bilateralmente no HDM. Em seguida,

estes foram submetidos à realização do teste no LTE. Para a realização deste teste, os animais tiveram três tentativas para realizar a esquiva inibitória, após serem colocados na parte distal do braço fechado do LTE. Cada tentativa era encerrada, quando o animal ultrapassava com as quatro patas o limite proximal da interseção central do aparato, ou quando o atingia-se o tempo limite de 300s. Os animais eram recolocados em suas caixas durante os intervalos de 30s entre cada tentativa. Após finalizar as tarefas de esquiva inibitória, os animais foram submetidos a outras três tentativas para avaliação do comportamento de fuga. Para tal, os animais foram colocados na parte distal do braço aberto do LTE (mesmo braço ao qual o animal foi pré-exposto no 1º dia). Da mesma forma que na realização da esquiva inibitória, cada tentativa era encerrada quando o animal ultrapassava o limite proximal da interseção central do aparato, ou quando atingia o tempo limite de 300s. Após 30s da realização das tarefas no LTE (esquiva inibitória e fuga), os animais foram colocados no centro de uma arena com o fundo quadriculado por 300s, e a quantidade de quadrados explorados pelos animais foi utilizado para avaliação da atividade locomotora. No 3º dia de experimentos, os animais foram novamente transferidos para a sala de experimentação e após 30 minutos de ambientação, estes foram reexpostos no LTE. Este teste de reexposição foi realizado da mesma forma previamente descrita, no entanto os animais tiveram apenas uma tentativa para realizar a esquiva inibitória e a fuga, e não três como no dia anterior (Sergio e cols., 2014; Zangrossi, Jr. & Graeff, 1997). Todos o procedimento experimental foi filmado para comprovação dos dados utilizados neste trabalho

### ***3.9.2 – Participação da inibição química do HDM no comportamento do tipo ansiedade e pânico, atividade locomotora e aquisição da memória.***

Com o intuito de investigar qual a influência da inibição química do HDM, em animais controle e obesos, no controle comportamental de esquiva e fuga, atividade locomotora e aquisição da memória o seguinte protocolo experimental foi realizado (Figura 7).

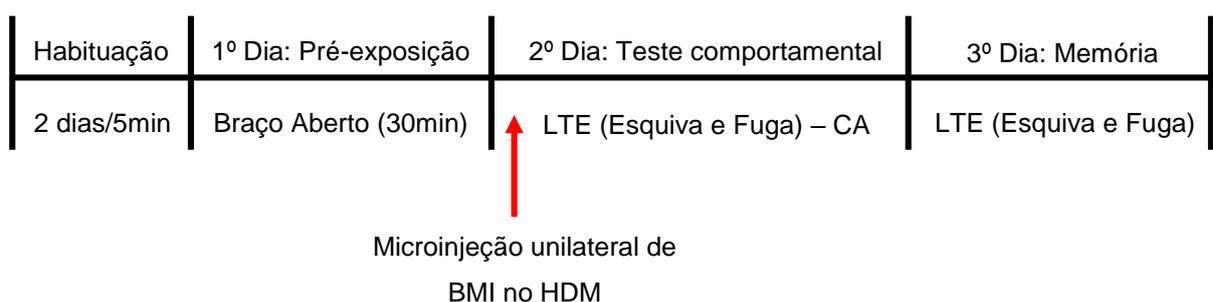


**Figura 8.** Protocolo experimental da inibição química do HDM por microinjeção bilateral de muscimol (100pmol/100nL) de animais submetidos ao teste comportamental no LTE, avaliação da atividade locomotora (CA) e aquisição de memória (LTE).

Os animais foram expostos ao mesmo procedimento detalhado no item anterior (3.9.1), porém os testes comportamentais do 2º dia foram iniciados após 10 minutos de ação da microinjeção bilateral do agonista GABA<sub>A</sub> muscimol no HDM.

### **3.9.3 – Participação da desinibição química do HDM no comportamento do tipo ansiedade e pânico, atividade locomotora e aquisição da memória.**

Com o intuito de investigar qual a influência da ativação química do HDM, em animais controle e obesos, na realização de tarefas comportamentais, de atividade locomotora e memória, o seguinte protocolo experimental foi realizado (Figura 8).



**Figura 9.** Escala temporal do protocolo experimental para avaliação da ativação química do HDM por microinjeção unilateral de BMI (10pmol/100nL), na realização de tarefas no teste comportamental do LTE, atividade locomotora (CA) e memória (LTE).

Os animais foram expostos ao mesmo procedimento detalhado no item anterior (3.9.1), porém os testes comportamentais do 2º dia foram iniciados imediatamente após a microinjeção unilateral do antagonista GABA<sub>A</sub> BMI no HDM.

### **3.10 – Procedimentos histológicos**

Para confirmação histológica dos sítios de microinjeção, ao final dos procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados com o dobro da dose utilizada da solução de ketamina + xilazina (volume 0,2mL/100g de animal – *i.m*) e realizou-se o procedimento de taracotomia para exposição do coração e posterior punção. Na sequência, realizou-se a perfusão transcardíaca com solução salina (0,9%) seguida por solução de paraformaldeído (4%). Após retirada do cérebro, o mesmo foi colocado em solução de paraformaldeído (4%) por 48 horas para fixação, e posteriormente transferido para solução de sacarose (20%) por 24 horas para desidratação. Cortes coronais de 50µm de espessura da região hipotalâmica foram feitos por meio do aparelho Criostato (Leica CM 1850, Alemanha. Realizou-se a montagem histológica dos cortes em lâminas previamente gelatinizadas, e estas foram corados com vermelho neutro (1%) e examinadas por microscopia ótica.

### **3.11 – Análise dos dados**

Para realização das análises de esquiva inibitória e fuga, nós utilizamos os tempos de latência (em segundos) previamente cronometrados, na realização das tarefas no LTE dos animais durante os dois dias de experimento. Para análise da atividade locomotora, foram registrados o número de vezes que o animal mudou de quadrado na arena utilizada no teste do CA, durante 300s.

### **3.11 – Análises estatísticas**

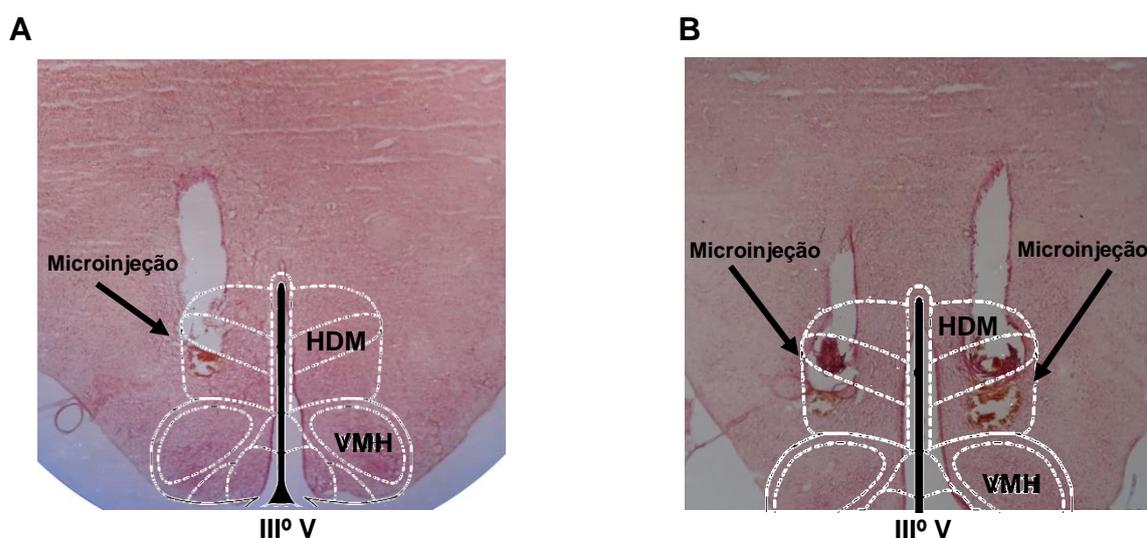
As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SPSS Statistics 20 (IMB SPSS® Inc.). Para comparar as alterações comportamentais dos grupos, utilizamos análise de variância ANOVA three-way (considerando a latência das 3 tentativas esquiva e fuga de cada animal como medidas repetidas) seguida por *pós-teste* de Tukey. Para análise da memória e atividade locomotora, utilizamos o teste *t de Student* não pareado. O nível de significância estabelecido foi de 5% ( $P < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em Média ± Erro Padrão da Média (Média ± EPM).

## 4 – RESULTADOS

Os resultados serão descritos de acordo com os diferentes grupos experimentais, sendo eles: controle PBS (C-PBS); obeso PBS (O-PBS); controle muscimol (C-MUS); obeso muscimol (O-MUS); controle bicuculina (C-BIC) e obeso bicuculina (O-BIC).

### 4.1 – Fotomicrografia dos sítios de microinjeção do HDM

Após a realização da perfusão transcardíaca e secções coronais dos cérebros foi possível confirmar os locais de microinjeção na região de estudo. A figura abaixo ilustra exemplos dos locais típicos de microinjeção unilateral de BMI (Figura 10A) e bilateral de veículo e/ou muscimol (Figura 10B) no HDM.



**Figura 10.** Fotomicrografia representativas dos locais de microinjeção no HDM. (A) sítio de microinjeção no HDM unilateral. (B) sítio de microinjeção bilateral no HDM. IIIº V = terceiro ventrículo; HDM = hipotálamo dorsomedial; VMH = hipotálamo ventrolmedial.

### 4.2 – Efeitos da DH sobre as alterações na composição de massa gorda de animais induzidos à obesidade.

Após o protocolo nutricional de 9 semanas, os animais que receberam DH (45% de gordura), apresentaram um aumento significativo do peso final ( $P < 0,0001$ ), ganho de peso ( $P < 0,0001$ ), aumento do peso dos tecidos abdominais brancos (epididimal,

retroperitoneal e inguinal) ( $P < 0,0001$ ), e aumento no índice de adiposidade (IA), no entanto os animais não apresentaram diferenças em relação ao índice de Lee ( $P = 0,5046$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeitos da DH sobre as alterações na composição de massa gorda em ratos *Wistar* após realização do protocolo nutricional de nove semanas.

Parâmetros	Controle (n=36)	Obeso (n=36)	P valor
Peso Inicial (g)	100 ± 10	100 ± 10	-
Peso Final (g)	312,9 ± 4,82	362,1 ± 5,09 <sup>#</sup>	$P < 0,0001$
Ganho de Peso (g)	213,1 ± 4,80	262,3 ± 5,01 <sup>#</sup>	$P < 0,0001$
Índice de Lee*	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,01	$P = 0,5046$
TAB Epididimal (g)	2,50 ± 0,20	5,99 ± 0,34 <sup>#</sup>	$P < 0,0001$
TAB Retroperitoneal (g)	1,94 ± 0,15	6,20 ± 0,33 <sup>#</sup>	$P < 0,0001$
TAB Inguinal (g)	5,16 ± 0,25	10,08 ± 0,54 <sup>#</sup>	$P < 0,0001$
Índice de Adiposidade**	3,05 ± 0,12	6,09 ± 0,21 <sup>#</sup>	$P < 0,0001$

Valores expresso em Média ± EPM; n, número de animais por grupo dietético (controle e obeso); TAB, tecido adiposo branco.

\*  $([\text{peso corporal final (g)}]^{1/3} \div \text{comprimento nasoanal (cm)} \times 100)$

\*\*  $\text{Massa gorda (epididimal + retroperitoneal + inguinal) (g)} \div \text{peso corporal final (g)} \times 100$

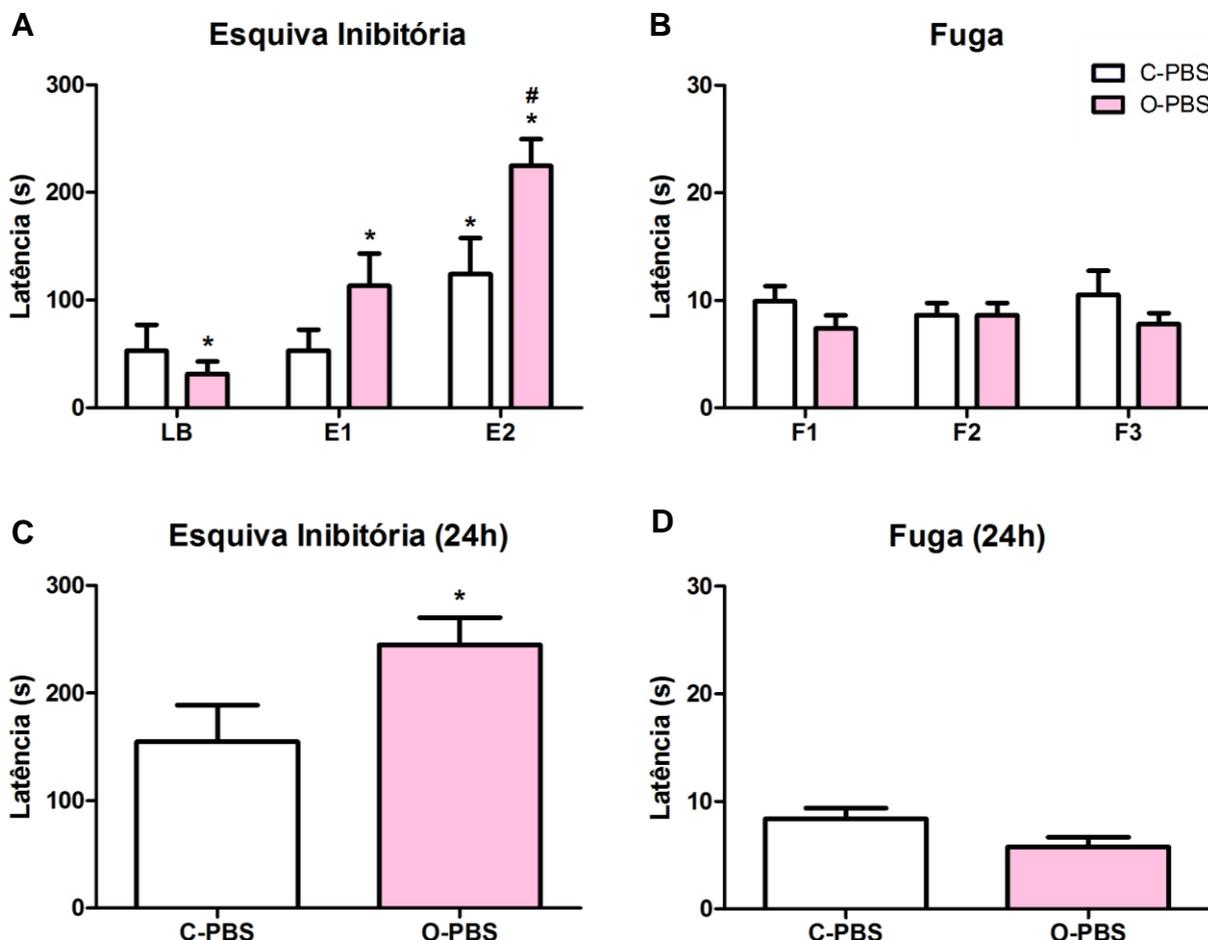
<sup>#</sup> Diferença estatística significativa entre os grupos; teste *t Student* não pareado.

### **4.3 – Influência da obesidade induzida por DH nas alterações comportamentais do tipo ansiedade, do tipo pânico, na atividade locomotora e na memória**

As respostas comportamentais dos grupos C-PBS e O-PBS, podem ser observadas na Figura 11. De acordo com as análises estatísticas observou-se um aumento no tempo de latência, de ambos os grupos, ao longo das três tentativas de esquiva inibitória no LTE, o que demonstra uma capacidade de aprendizado destes animais [ $F_{(2,60)} = 24,81$ ;  $p < 0,0001$ ]. Não foram observadas interferências em relação a droga (PBS) nos grupos [ $F_{(1,60)} = 2,83$ ; NS]. No entanto, observou-se uma diferença estatística na interação (tentativas vs droga) do grupo controle e do grupo tratado com DH [ $F_{(2,60)} = 5,24$ ;  $p = 0,0080$ ], sugerindo que os animais induzidos à obesidade por DH são mais propensos a desenvolver um comportamento do tipo ansiedade, (ANOVA two-way, pós-teste Bonferroni) (Figura 11A).

A avaliação do comportamento de fuga destes grupos no LTE após microinjeção bilateral de veículo PBS pode ser observada na Figura 11B. A análise estatística demonstrou que não houve qualquer diferença entre as tentativas [ $F_{(2,60)} =$

0,10; NS], droga [ $F_{(1,60)} = 1,84$ ; NS] e interação entre tentativas e droga [ $F_{(2,60)} = 0,64$ ; NS] (ANOVA two-way, *pós-teste* Bonferroni).



**Figura 11.** Latência das tentativas de esquiva inibitória e fuga realizada no LTE em dois dias consecutivos de experimentação, em ratos controle ( $n = 16$ ) e obeso ( $n = 16$ ) que receberam microinjeção de veículo PBS (100nL) no HDM. (A) Esquiva inibitória em três tentativas. (B) Fuga em três tentativas. (C) Esquiva inibitória (após 24 horas) em uma tentativa. (D) Fuga (após 24 horas) em uma tentativa. LB = linha de base; E = esquiva; F = fuga. Valores expresso em Média  $\pm$  EPM, \*\*# nível de significância  $p < 0,05$ , (A) C-PBS:  $E2 \neq E1$ ;  $E2 \neq BL$ ; O-PBS:  $E2 \neq BL$ ,  $E2 \neq E1$ ,  $E1 \neq BL$ ; C-PBS  $E2 \neq$  O-PBS  $E2$ ; (C) C-PBS  $\neq$  O-PBS.

Em relação à consolidação da memória relacionada a esquiva inibitória realizada após 24h no LTE, observou-se que os animais controle apresentam um menor tempo de latência quando comparados aos animais obesos ( $154,9 \pm 34,01$  vs  $244,8 \pm 25,01$ ;  $p = 0,0427$ ; *t-Student não pareado*) (Figura 11C). Em relação à

reexposição dos animais ao teste de fuga (que não se caracteriza como memória) no LTE, não foram observadas diferenças significativas nos tempos de latências ( $8,38 \pm 0,98$  vs  $5,75 \pm 0,92$ ; NS; *t-Student não pareado*) (Figura 11D).

Em relação a atividade locomotora, observou-se que não houve diferença entre a quantidade de quadrados percorridos entre os animais dos grupos controle e obeso no CA ( $46,70 \pm 3,96$  vs  $56,40 \pm 3,89$ ; NS; *t-Student não pareado*) (Tabela 3).

#### **4.4 – Efeitos da inibição química do HDM nas alterações comportamentais do tipo ansiedade, do tipo pânico, na atividade locomotora e na memória**

Com o intuito de avaliar as alterações comportamentais de animais que receberam inibição química por muscimol no HDM, os protocolos experimentais no LTE e CA foram realizados nos grupos a seguir.

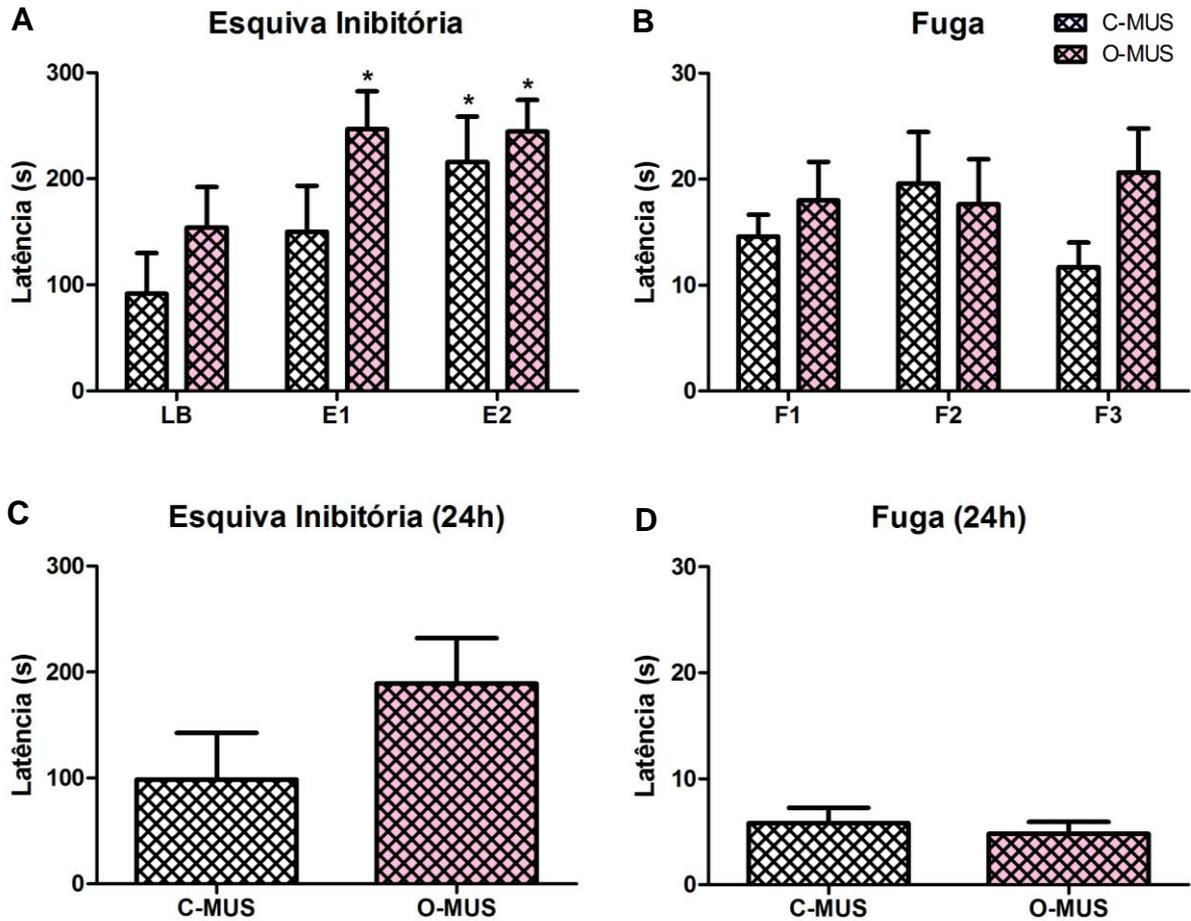
##### **4.4.1 – Grupo Controle Muscimol x Obeso Muscimol**

Quando comparamos os grupos C-MUS com o grupo O-MUS, observamos um aumento do tempo de latência na esQUIVA inibitória dos animais no LTE ao longo das tentativas, o que demonstra que estes animais continuam desenvolvendo a capacidade de aprendizado, apesar da administração do agonista GABA<sub>A</sub> muscimol [ $F_{(2,38)} = 8,38$ ;  $p < 0,0010$ ]. Não houve diferença estatística em relação a droga [ $F_{(1,38)} = 2,05$ ; NS], e interação entre tentativa e droga [ $F_{(2,38)} = 0,80$ ; NS] (ANOVA two-way, *pós-teste Bonferroni*) (Figura 12A).

A avaliação do comportamento de fuga dos animais no LTE após microinjeção bilateral de muscimol pode ser observada na Figura 12B. A análise demonstrou que não houve qualquer diferença entre as tentativas [ $F_{(2,38)} = 0,39$ ; NS], droga [ $F_{(1,38)} = 0,81$ ; NS] e interação entre tentativas e droga [ $F_{(2,38)} = 1,51$ ; NS] (ANOVA two-way, *pós-teste Bonferroni*).

Em relação à consolidação da memória relacionada a esQUIVA inibitória realizada após 24 horas no LTE, não foram observadas diferenças estatística entre os grupos C-MUS e O-MUS ( $98,60 \pm 43,96$  vs  $189,30 \pm 42,92$ ; NS; *t-Student não pareado*) (Figura 12C). Em relação à reexposição dos animais ao teste de fuga no LTE, também não foi observada diferença significativa ( $5,80 \pm 1,46$  vs  $4,82 \pm 1,09$ ; NS; *t-Student não pareado*) (Figura 12D).

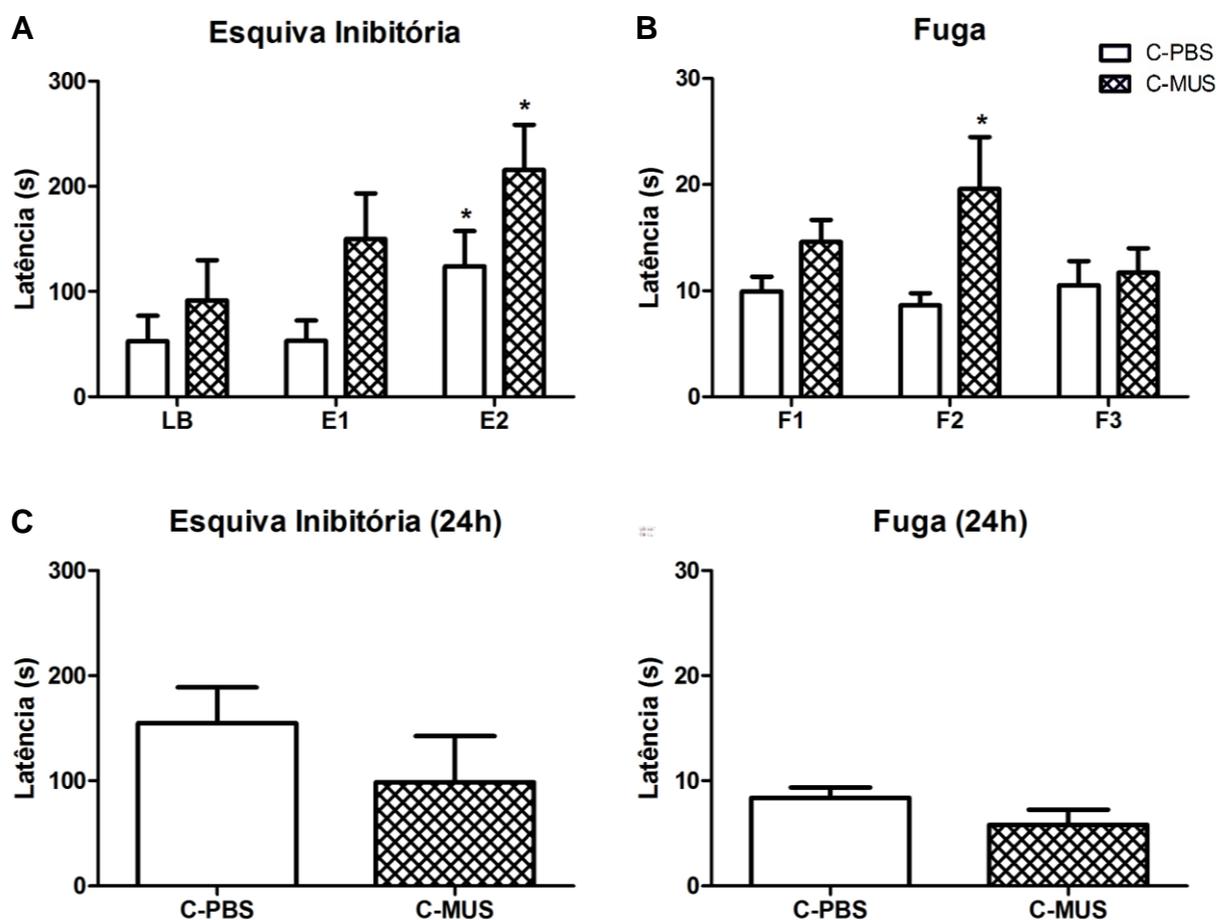
Em relação a atividade locomotora, observou-se que não houve diferença entre a quantidade de quadrados explorados pelos animais dos grupos C-MUS e O-MUS no CA ( $59,80 \pm 7,01$  vs  $43,91 \pm 4,57$ ; NS; *t-Student* não pareado), como demonstrado na Tabela 3.



**Figura 12.** Tempo de latência das diferentes tentativas de esquiva inibitória e fuga realizada no LTE em dois dias consecutivos de experimentação, em ratos controle muscimol ( $n = 10$ ) e obeso muscimol ( $n = 11$ ) que receberam microinjeção de agonista  $GABA_A$  muscimol ( $100\text{pmol}/100\text{nL}$ ) no HDM(A) Esquiva inibitória em três tentativas. (B) Fuga em três tentativas. (C) Esquiva inibitória (após 24 horas) em uma tentativa. (D) Fuga (após 24 horas) em uma tentativa. LB = linha de base; E = esquiva; F = fuga. Valores expresso em Média  $\pm$  EPM, \*nível de significância  $p < 0,05$ , (A) C-MUS:  $BL \neq E2$ ; O-MUS:  $BL \neq E1$ ,  $BL \neq E2$ .

#### 4.4.2 – Grupo Controle Veículo x Controle Muscimol

Quando comparamos os grupos C-PBS com o grupo C-MUS, observamos um aumento do tempo de latência dos animais de ambos os grupos na esquiva inibitória no LTE [ $F_{(2,48)} = 9,36$ ;  $p < 0,0004$ ]. Não houve diferença estatística em relação a droga [ $F_{(1,48)} = 3,87$ ; NS], e não houve interação (tentativa vs droga) [ $F_{(2,48)} = 0,96$ ; NS] (ANOVA two-way, pós-teste Bonferroni) (Figura 13A).



**Figura 13.** Tempo de latência das diferentes tentativas de esquiva inibitória e fuga realizada no LTE em dois dias consecutivos de experimentação, em ratos controle PBS ( $n = 16$ ) e controle muscimol ( $n = 10$ ) que receberam microinjeção de veículo (100nL) e muscimol (100pmol/100nL) no HDM. (A) Esquiva inibitória em três tentativas. (B) Fuga em três tentativas. (C) Esquiva inibitória (após 24 horas) em uma tentativa. (D) Fuga (após 24 horas) em uma tentativa. LB = linha de base; E = esquiva; F = fuga. Valores expresso em Média  $\pm$  EPM, \*nível de significância  $p < 0,05$ . (A) C-PBS: BL $\neq$ E2, E1 $\neq$ E2; C-MUS: BL $\neq$ E2. (B) C-MUS F2 $\neq$ C-MUS F2.

A avaliação do comportamento de fuga dos animais no LTE pode ser observada na Figura 13B. Não houve diferença estatística entre as tentativas [ $F_{(2,48)} = 1,06$ ; NS], e a interação (tentativa e droga) [ $F_{(2,48)} = 2,81$ ; NS]. No entanto, a droga [ $F_{(1,48)} = 5,75$ ;  $p=0,0246$ ] foi eficiente em aumentar o tempo de latência de fuga (fugir do braço aberto) na F2 do grupo C-MUS em comparação ao C-PBS, o que sugere um possível efeito ansiolítico/panicolítico do muscimol (ANOVA two-way, *pós-teste* Bonferroni).

Em relação à consolidação da memória relacionada a esQUIVA inibitória realizada após 24 horas no LTE, observou-se que não houve diferenças estatísticas entre animais C-PBS e C-MUS ( $154,90 \pm 34,01$  vs  $98,60 \pm 43,96$ ; NS; *t-Student* não pareado) (Figura 13C). Em relação à reexposição dos animais ao teste de fuga no LTE, também não foi observada diferença significativa no tempo de latência ( $8,38 \pm 0,98$  vs  $5,80 \pm 1,46$ ; NS; *t-Student* não pareado) (Figura 13D).

Em relação a atividade locomotora, observou-se que não houve diferença entre a quantidade de quadrados explorados pelos animais dos grupos C-PBS e C-MUS no CA ( $46,70 \pm 3,95$  vs  $59,80 \pm 7,00$ ; NS; *t-Student* não pareado) (Tabela 3).

#### **4.4.3 – Grupo Obeso Veículo x Obeso Muscimol**

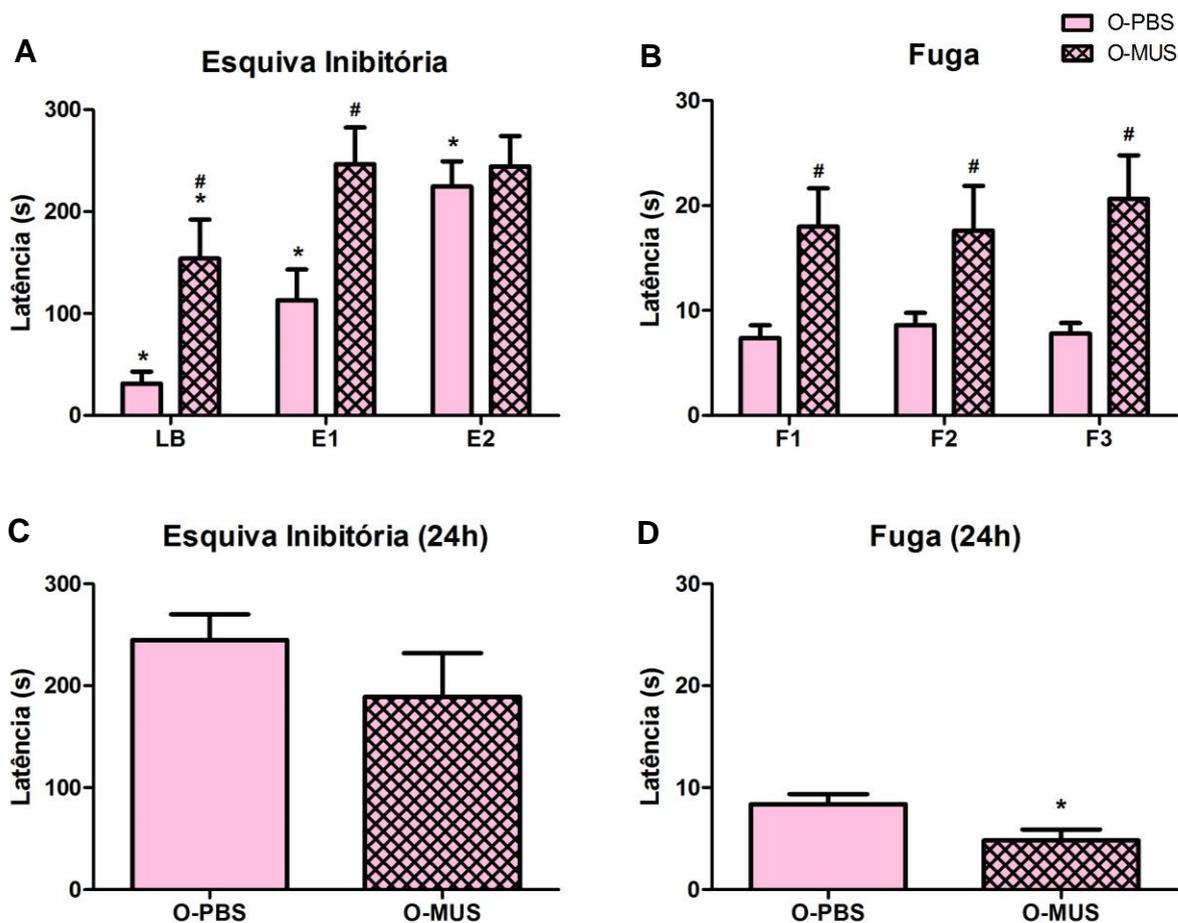
Quando comparamos os grupos O-PBS com o grupo O-MUS, supreendentemente observamos um aumento significativo no tempo de latência na esQUIVA inibitória no grupo obeso que recebeu a microinjeção de muscimol [ $F_{(1,50)} = 8,90$ ;  $p=0,0063$ ] no LTE. Ambos os grupos apresentaram diferença ao longo das tentativas [ $F_{(2,50)} = 20,48$ ;  $p<0,0001$ ], e ainda foi observado diferença estatística na interação entre as tentativas e a inibição química pela droga [ $F_{(2,50)} = 3,93$ ;  $p=0,0260$ ] (ANOVA two-way, *pós-teste* Bonferroni) (Figura 14A).

A avaliação do comportamento de fuga dos animais no LTE pode ser observada na Figura 14B. Não houve diferença estatística entre as tentativas [ $F_{(2,50)} = 0,27$ ; NS], e a interação de tentativas e droga [ $F_{(2,50)} = 0,39$ ; NS], mas a administração de muscimol foi eficiente em aumentar o tempo de latência de fuga do braço aberto na F1, F2 e F3, o que também sugere um importante efeito ansiolítico/panicolítico desta droga [ $F_{(1,50)} = 18,04$ ;  $p=0,0003$ ] (ANOVA two-way, *pós-teste* Bonferroni).

Em relação à consolidação da memória relacionada a esQUIVA inibitória realizada após 24 horas no LTE, observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos O-PBS e O-MUS ( $244,8 \pm 25,41$  vs  $189,3 \pm 42,92$ ; NS; *t-Student* não

pareado) (Figura 14C). No entanto, na reexposição dos animais ao teste de fuga no LTE, observou-se diferença significativa no tempo de latência de fuga no grupo O-MUS ( $8,37 \pm 0,98$  vs  $4,82 \pm 1,01$ ;  $p=0,0248$ ; *t-Student* não pareado) (Figura 14D).

Em relação a atividade locomotora, não houve diferença entre a quantidade de quadrados percorridos pelos animais dos grupos O-PBS e O-MUS no CA ( $46,70 \pm 3,95$  vs  $43,91 \pm 4,57$ ; NS; *t-Student* não pareado) (Tabela 3).



**Figura 14.** Tempo de latência das diferentes tentativas de esquiva inibitória e fuga realizada no LTE em dois dias consecutivos de experimentação, em ratos obesos veículo (n = 16) e obeso muscimol (n = 11) que receberam microinjeção de PBS (100nL) e muscimol (100pmol/100nL) no HDM. (A) Esquiva inibitória em três tentativas. (B) Fuga em três tentativas. (C) Esquiva inibitória (após 24 horas) em uma tentativa. (D) Fuga (após 24 horas) em uma tentativa. LB = linha de base; E = esquiva; F = fuga. Valores expresso em Média  $\pm$  EPM, \*# nível de significância  $p < 0,05$ . (A) O-PBS: BL $\neq$ E1, BL $\neq$ E2, E1 $\neq$ E2; O-MUS: BL $\neq$ E1, BL $\neq$ E2; O-MUS BL $\neq$ C-MUS, O-MUS E1  $\neq$  O-PBS E1. (B) O-MUS F1, F2, F3  $\neq$  O-PBS F1, F2, F3. (D) O-MUS  $\neq$  O-PBS.

#### **4.5 – Efeitos da ativação química do HDM nas alterações comportamentais do tipo ansiedade, do tipo pânico, na atividade locomotora e na memória**

Com o intuito de avaliar as alterações comportamentais de animais que receberam estimulação química por *bicuculine methiodide* no HDM, os mesmos protocolos já descritos foram realizados nos grupos a seguir.

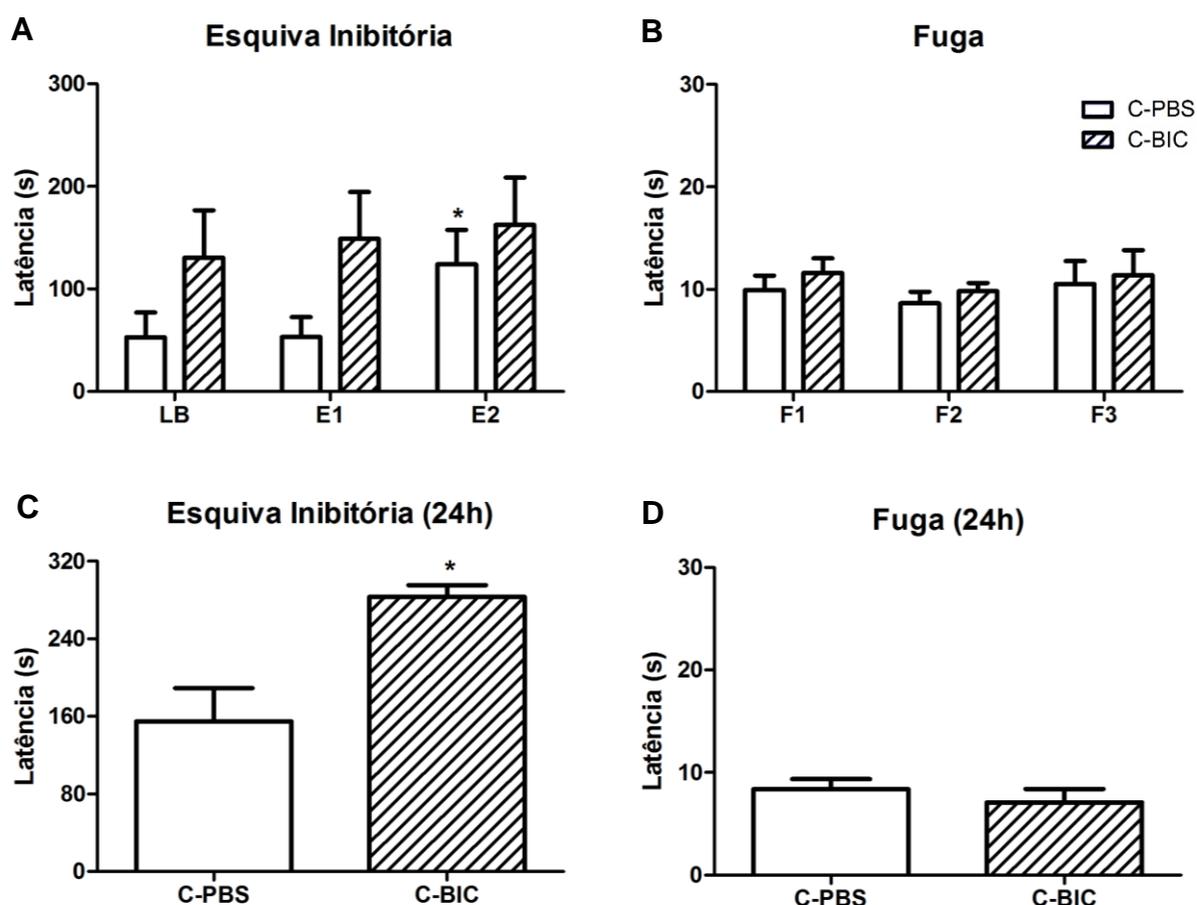
##### **4.5.1 – Grupo Controle Veículo x Controle Bicuculina**

Comparamos os grupos C-PBS e o grupo C-BIC, e observamos que houve diferenças estatísticas em relação a tentativas no LTE [ $F_{(2,48)} = 4,65$ ;  $p=0,0142$ ], no grupo controle, indicando um comprometimento da capacidade de aprendizado nos animais tratados com BMI no LTE. Não foram encontradas diferenças em relação ao tratamento [ $F_{(1,48)} = 2,51$ ; NS], e interação das tentativas e droga [ $F_{(2,48)} = 1,31$ ; NS]. Como já descrito anteriormente, o grupo C-PBS foi capaz de aprender durante as exposições (ANOVA two-way, *pós-teste* Bonferroni) (Figura 15A).

A avaliação do comportamento de fuga dos animais no LTE após microinjeção bilateral de veículo e unilateral de bicuculina pode ser observada na Figura 15B. Não houve diferença estatística entre as tentativas [ $F_{(2,48)} = 0,65$ ; NS], droga [ $F_{(1,48)} = 0,61$ ; NS], e interação de tentativas e droga [ $F_{(2,48)} = 0,03$ ; NS] (ANOVA two-way, *pós-teste* Bonferroni).

Em relação à consolidação da memória relacionada a esQUIVA inibitória realizada após 24 horas no LTE, observou-se que houve diferença estatística entre animais C-PBS e C-MUS ( $154,90 \pm 34,01$  vs  $283,20 \pm 11,76$ ;  $p=0,0080$ ; *t-Student* não pareado), demonstrando que animais previamente estimulado quimicamente por antagonista GABA<sub>A</sub> apresentam um prolongamento do tempo de duração da memória relacionada a locais aversivos, ou que causem medo (Figura 15C). Em relação à reexposição dos animais ao teste de fuga no LTE, não foi observada diferença significativa no tempo de latência, entre estes grupos ( $8,37 \pm 0,98$  vs  $7,10 \pm 1,31$ ; NS; *t-Student* não pareado) (Figura 15D).

Em relação a atividade locomotora, analisada por meio de teste *t-Student*, observou-se que não houve diferença entre a quantidade de quadrados explorados pelos animais dos grupos O-PBS e O-MUS no teste do CA ( $46,70 \pm 3,95$  vs  $60,90 \pm 7,31$ ; NS; *t-Student* não pareado), como demonstrado na Tabela 3.

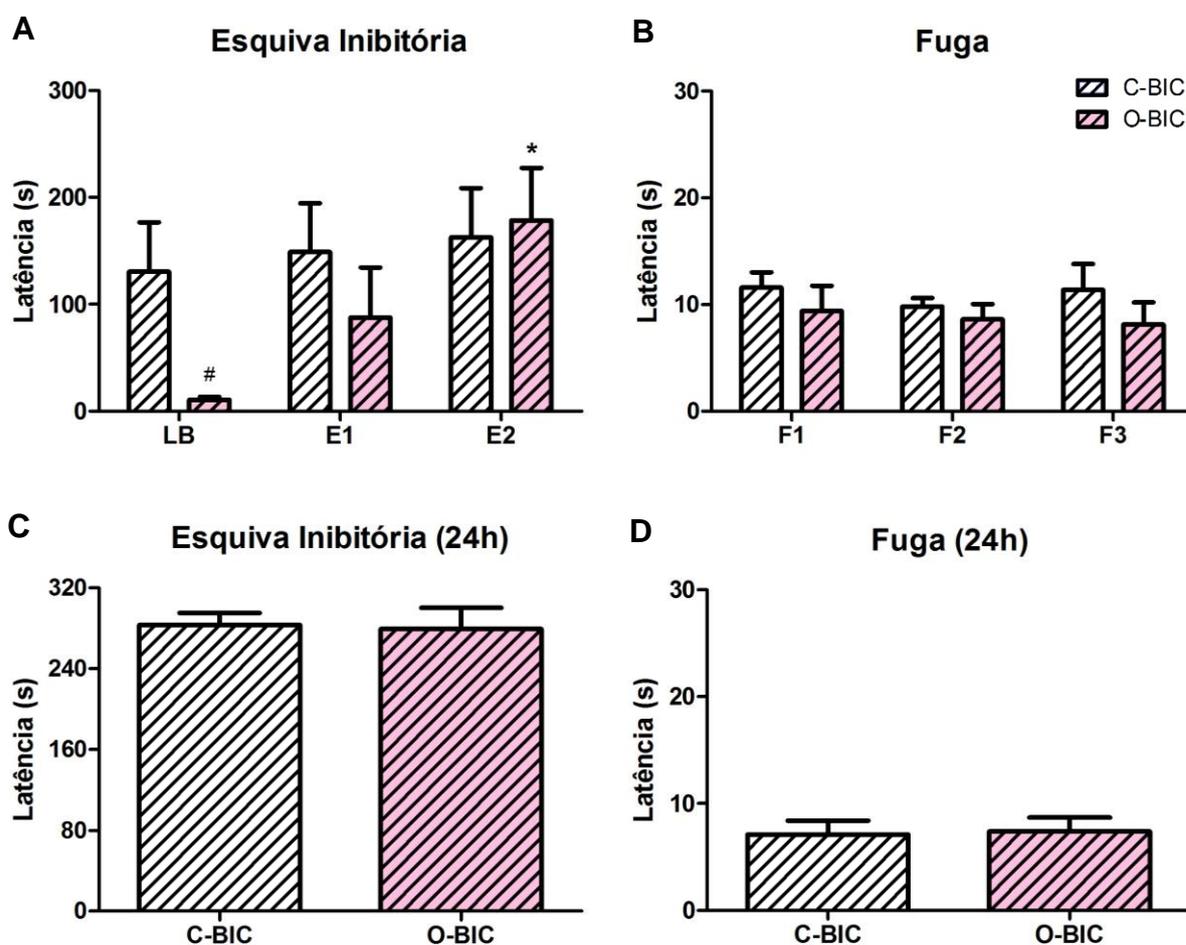


**Figura 15.** Tempo de latência das diferentes tentativas de esquiva inibitória e fuga realizada no LTE em dois dias consecutivos de experimentação, em ratos controle veículo ( $n = 16$ ) e controle bicuculina ( $n = 10$ ) que receberam microinjeção de PBS (100nL) e *bicuculine methiodide* (10pmol/100nL) no HDM. (A) Esquiva inibitória em três tentativas. (B) Fuga em três tentativas. (C) Esquiva inibitória (após 24 horas) em uma tentativa. (D) Fuga (após 24 horas) em uma tentativa. LB = linha de base; E = esquiva; F = fuga. Valores expresso em Média  $\pm$  EPM, \* nível de significância  $p < 0,05$ . (A) C-PBS: E2 $\neq$ BL, E1 $\neq$ BL. (C) C-BIC  $\neq$  C-PBS.

#### 4.5.2 – Grupo Controle Bicuculina x Obeso Bicuculina

Comparamos os grupos C-BIC e o grupo O-BIC, e observamos que houve diferença estatística em relação as tentativas [ $F_{(2,32)} = 9,19$ ;  $p=0007$ ] de esquiva inibitória no LTE, e entre a interação das tentativas e a droga [ $F_{(2,32)} = 4,25$ ;  $p=0,0230$ ]. Não foi observado diferença estatística em relação a droga [ $F_{(1,32)} = 0,96$ ; NS] (ANOVA two-way, *pós-teste* Bonferroni) (Figura 16A).

A avaliação do comportamento de fuga dos animais no LTE após microinjeção unilateral de bicuculina pode ser observada na Figura 15B. Não houve diferença estatística entre as tentativas [ $F_{(2,32)} = 0,26$ ; NS], droga [ $F_{(1,32)} = 1,91$ ; NS], e interação entre as tentativas e droga [ $F_{(2,32)} = 0,18$ ; NS] (ANOVA two-way, *pós-teste* Bonferroni).



**Figura 16.** Tempo de latência das diferentes tentativas de esquiva inibitória e fuga realizada no LTE em dois dias consecutivos de experimentação, em ratos controle bicuculina ( $n = 10$ ) e obeso bicuculina ( $n = 8$ ) que receberam microinjeção unilateral de *bicuculine methiodide* (10pmol/100nL) no HDM. (A) Esquiva inibitória em três tentativas. (B) Fuga em três tentativas. (C) Esquiva inibitória (após 24 horas) em uma tentativa. (D) Fuga (após 24 horas) em uma tentativa. LB = linha de base; E = esquiva; F = fuga. Valores expresso em Média  $\pm$  EPM, <sup>#</sup> nível de significância  $p < 0,05$ . (A) O-BIC: BL $\neq$ E2; C-BIC BL  $\neq$  O-BIC BL.

Em relação à consolidação da memória relacionada a esquiva inibitória realizada após 24 horas no LTE, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos ( $283,20 \pm 11,76$  vs  $281,60 \pm 18,44$ ; NS; *t-Student* não pareado) (Figura

16C). Em relação à reexposição dos animais ao teste de fuga no LTE, também não observamos diferença estatística no tempo de latência ( $7,10 \pm 1,30$  vs  $7,00 \pm 1,21$ ; NS; *t-Student* não pareado) (Figura 16D).

Em relação a atividade locomotora, não houve diferença entre a quantidade de quadrados explorados pelos animais dos grupos O-PBS e O-MUS no CA ( $60,90 \pm 7,32$  vs  $60,22 \pm 7,97$ ; NS; *t-Student* não pareado), como demonstrado na Tabela 3.

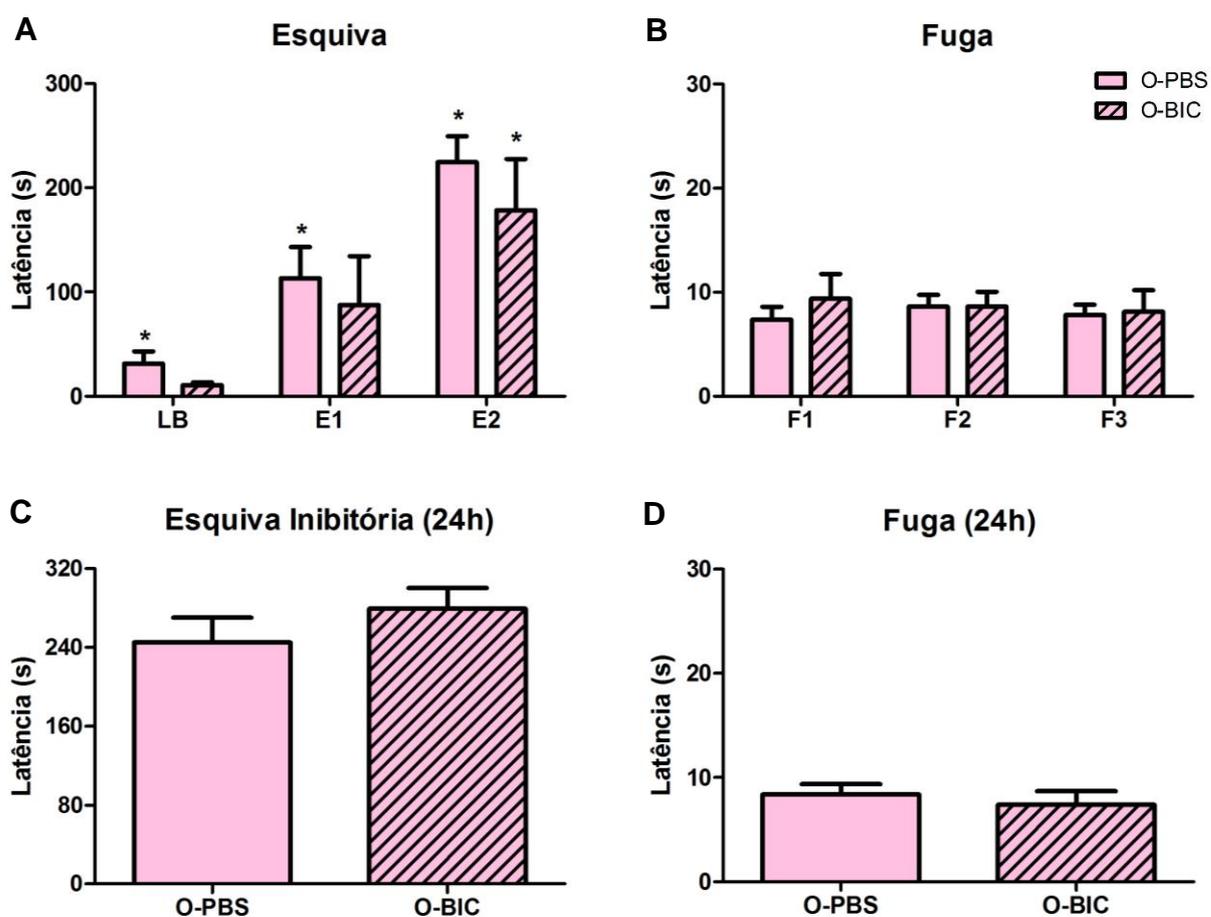
#### **4.5.3 – Grupo Obeso Veículo x Obeso Bicuculina**

Comparamos os grupos O-PBS e o grupo O-BIC, observamos que houve diferença estatística em relação as tentativas [ $F_{(2,44)} = 24,27$ ;  $p < 0001$ ] de esQUIVA inibitória no LTE. Não houve diferença estatística em relação a droga [ $F_{(1,44)} = 0,99$ ; NS], e entre a interação de tentativa e a droga [ $F_{(2,44)} = 0,13$ ; NS] (ANOVA two-way, pós-teste Bonferroni) (Figura 17A).

A avaliação do comportamento de fuga dos animais no LTE após microinjeção bilateral de veículo e unilateral de bicuculina pode ser observada na Figura 17B. Não houve diferença estatística entre as tentativas [ $F_{(2,44)} = 0,11$ ; NS], droga [ $F_{(1,44)} = 0,33$ ; NS], e entre a interação da tentativa e droga [ $F_{(2,44)} = 0,29$ ; NS] (ANOVA two-way, pós-teste Bonferroni).

Em relação à consolidação da memória na esQUIVA inibitória realizada após 24 horas no LTE, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos O-PBS e O-BIC ( $244,80 \pm 25,41$  vs  $281,60 \pm 18,44$ ; NS; *t-Student* não pareado) (Figura 17C). Em relação à reexposição dos animais à fuga no LTE, também não observamos diferença estatística no tempo de latência ( $8,38 \pm 0,99$  vs  $7,00 \pm 1,21$ ; NS; *t-Student* não pareado) (Figura 17D).

Em relação a atividade locomotora, não houve diferença entre a quantidade de quadrados explorados pelos animais dos grupos O-PBS e O-MUS no CA ( $46,70 \pm 3,96$  vs  $60,22 \pm 7,97$ ; NS; *t-Student* não pareado), como demonstrado na Tabela 3.



**Figura 17.** Tempo de latência das diferentes tentativas de esquiva inibitória e fuga realizada no LTE em dois dias consecutivos de experimentação, em ratos obeso veículo ( $n = 16$ ) e obeso bicuculina ( $n = 8$ ) que receberam microinjeção bilateral de PBS (100nL) e unilateral de *bicuculine methiodide* (10pmol/100nL) no HDM. (A) Esquiva inibitória em três tentativas. (B) Fuga em três tentativas. (C) Esquiva inibitória (após 24 horas) em uma tentativa. (D) Fuga (após 24 horas) em uma tentativa. LB = linha de base; E = esquiva; F = fuga. Valores expresso em Média  $\pm$  EPM, \* nível de significância  $p < 0,05$ . (A) O-PBS:  $BL \neq E2$ ,  $BL \neq E1$ ,  $E1 \neq E2$ ; O-BIC:  $E2 \neq BL$ .

#### 4.6 – Avaliação da Atividade Locomotora

Após realização do teste no LTE, todos os animais foram submetidos à avaliação da atividade locomotora, com o intuito de investigar algum efeito colateral decorrente dos tratamentos com agonistas e antagonista  $GABA_A$ , como demonstrado na tabela 3.

**Tabela 3.** Avaliação da atividade locomotora de animais submetidos ao CA.

Grupos	Quadrantes Percorridos	P valor
C-PBS vs O-PBS	46,70 ± 3,96 vs 56,40 ± 3,89	P=0,0973
C-PBS vs C-MUS	46,70 ± 3,96 vs 59,80 ± 7,01	P=0,1207
C-PBS vs C-BIC	46,70 ± 3,96 vs 60,90 ± 7,32	P=0,1049
C-MUS vs O-MUS	59,80 ± 7,01 vs 43,91 ± 4,57	P=0,0679
C-BIC vs O-BIC	60,90 ± 7,32 vs 60,22 ± 7,97	P=0,9507
O-PBS vs O-MUS	46,70 ± 3,89 vs 43,91 ± 4,57	P=0,6525
O-PBS vs O-BIC	46,70 ± 3,89 vs 60,22 ± 7,97	P=0,1350

Valores expresso em Média ± EPM; *n*, número de animais onde: C-PBS = 10; O-PBS = 10; C-MUS = 10; C-BIC = 10; C-MUS = 9; O-MUS = 11; O-BIC = 8; nível de significância  $p < 0,05$ ; teste *t Student* não pareado.

## 5 – DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que a DH foi eficiente em alterar a composição corporal dos animais, provocando uma eficiente indução da obesidade. Além disto, vimos que a obesidade foi capaz de induzir alterações comportamentais do tipo ansiedade no teste do LTE. Nossos dados demonstram ainda que os animais obesos, quando reexpostos ao LTE após 24 horas, continuaram apresentando o comportamento do tipo ansiedade, o que sugere uma relação positiva entre o medo e a ansiedade. Não foram observadas alterações em relação ao comportamento do tipo pânico nestes animais no LTE, tão pouco na reexposição após 24 horas.

Diversos estudos epidemiológicos e em modelos animais, que investigam os comprometimentos gerados pela obesidade, sugerem que o alto teor no consumo de gordura saturada, que é tida como mais nociva ao organismo, é um dos principais fatores no desenvolvimento desta patologia (Ikemoto e cols., 1995; Mochcovitch e cols., 2014; Abildgaard e cols., 2011; Abildgaard e cols., 2014; Locke e cols., 2015). Em estudo realizado por Wang e cols., foi demonstrado que os diferentes subtipos de lipídios são capazes de provocar modificações nos mecanismos regulatórios periféricos, bem como na alteração da composição da membrana lipídica, o que favorece a entrada de ácidos graxos livres pela barreira hematocefálica, atingindo o SNC e favorecendo um comprometimento hipotalâmico. Neste estudo, foi demonstrado ainda que os animais alimentados com uma dieta hiperlipídica apresentaram um aumento da imunorreatividade c-Fos no núcleo lateral desta região o que, aparentemente, favorece o aumento da adiposidade (Wang e cols., 2002; de Souza e cols., 2005).

Em nosso trabalho, utilizamos o protocolo nutricional para induzir a obesidade previamente padronizado por Abreu e cols., onde os animais pós-desmame ( $100 \pm 10$ g), foram alimentados com dieta DH (45% kcal de gordura – banha de porco) por um período de 9 semanas. Corroborando aos seus achados, nossos resultados também demonstram um efetivo desenvolvimento da obesidade (Abreu e cols., 2014). Estudos demonstram que o ganho de peso em ratos alimentados com dieta rica em gordura de porco é maior do que em animais alimentados com dieta rica em óleo de canola (Hariri e cols., 2010). Outros estudos não encontraram diferença no peso corporal final de ratos Sprague-Dawley adultos alimentados por 4 semanas com dietas

hiperlipídicas que apresentavam teor moderado ou baixo de gordura saturada, entre 33% a 45% de gordura proveniente do óleo de cártamo (baixo teor de SFA), óleo de peixe (moderado teor de SFA), ou gordura de carne (moderado teor de SFA) (Awad e cols., 1990). Ratos Wistar adultos alimentados com uma dieta rica em manteiga, com 52% de calorias desta fonte, durante 5 semanas apresentaram um maior ganho de peso corporal do que ratos alimentados com óleo de milho nesta mesma porcentagem (Hariri e cols., 2010), e ratos Wistar, recém desmamados, alimentados com dieta rica em óleo de coco, manteiga e cacau (27% de lipídios) durante 8 semanas tiveram um maior ganho de peso do que ratos alimentados com dietas a base de óleo de canola e soja (Calder e cols., 1995). Buettner e cols., demonstrou que ratos Wistar adultos alimentados com DH baseada em banha de porco (42% de gordura), não apresentaram aumento no ganho de peso significativo quando comparados com o grupo alimentado com dieta baseada em óleo de oliva (baixo teor de SFA) durante 12 semanas, mas não demonstrou esta relação em comparação aos ratos alimentados com dieta padrão (11% de gordura) (Buettner e cols., 2006). Catta-Preta e cols, demonstrou que a dieta hiperlipídica rica em SFA é capaz de induzir o ganho de peso, porém, este aumento não está relacionado a um maior consumo de ração. Isto significa que animais alimentados com DH rica em SFA estocam uma maior quantidade de gordura sem necessariamente aumentar o consumo de calorias, o que sugere que o aumento de gordura corporal e o desenvolvimento da obesidade está intimamente relacionada à fonte lipídica ingerida (Catta-Preta e cols., 2012).

Neste sentido, a obesidade em modelos animais, pode ser mensurada por meio da adequada quantificação do tecido adiposo corporal, e não apenas baseada no ganho de peso, e o acúmulo deste tecido em compartimentos viscerais e subcutâneos representam uma medida capaz de refletir alterações metabólicas associadas à obesidade (Judex e cols., 2010). Neste sentido, para avaliar o aumento de tecido adiposo no nosso modelo de obesidade, consideramos três principais depósitos adiposos, sendo o tecido subcutâneo entre a parte inferior da caixa torácica e o meio da coxa a gordura inguinal, o tecido ligado a parede abdominal posterior próxima aos rins e a porção abdominal dos ureteres a gordura retroperitoneal, e o tecido abdominal na parte inferior do abdômen ligado ao epidídimo o tecido epididimal (Catta-Preta e cols., 2012). A partir destas determinações, mensuramos em nosso modelo animal, os valores destes três tecidos adiposos brancos (epididimal, retroperitoneal e inguinal),

o peso corporal final, e os índices de adiposidade (IA) e de Lee (Costa e cols., 2011; Chongsa e cols., 2014; Woods e cols., 2003; Thibault e cols., 2004). Observamos que os animais alimentados com DH apresentaram um aumento significativo do peso corporal final, do IA e ainda aumento no peso dos tecidos brancos adiposos epididimal, retroperitonial e inguinal, o que indica uma efetiva capacidade desta DH em induzir a obesidade nos animais. O tecido adiposo é um órgão extremamente ativo metabolicamente, e apresenta um potencial ilimitado de crescimento durante qualquer fase da vida, podendo ser subdividido em dois tipos: adiposo subcutâneo e adiposo visceral. Este último vem sendo associado ao desenvolvimento de diferentes efeitos negativos que comprometem o organismo, e clinicamente é tido como mais nocivo quando comparado à gordura corporal generalizada, devido principalmente à sua capacidade de favorecer a resistência insulínica e promover o aumento de citocinas pró-inflamatórias tais como, leptina, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6) (Zhao & Lawless, 2013). No entanto não observamos diferenças entre os grupos controle e obeso, quando utilizamos o critério do Índice de Lee, que determina a obesidade baseado em parâmetros biométricos (comprimento naso-anal), e que não é sensível para determinar alterações na composição corporal de gordura central em animais com mesma idade e submetidos ao mesmo histórico nutricional (Bernardis & Patterson, 1968; Stephens, 1980).

Ao nosso ver este é o primeiro trabalho que relaciona a obesidade e os transtornos de ansiedade em animais induzidos a obesidade por DH no teste do LTE, aparato capaz de identificar com maior precisão dois diferentes tipos de transtornos de ansiedade (como já descrito). A obesidade em nosso trabalho foi eficiente em promover o comportamento do tipo ansiedade no LTE, resultado evidenciado pelo aumento do tempo de latência dos animais quando expostos ao braço fechado deste aparato. Outros autores já observaram que a exposição crônica a DH (pré e pós-desmame) de ratos aumentam o comportamento do tipo ansiedade em testes comportamentais realizados no Campo Aberto e no LCE (Bilbo & Tsang, 2010; Sasaki e cols., 2014), o que demonstra que alterações nutricionais precoces podem provocar mudanças epigenéticas (fenômeno biológico que determina a relação entre os estímulos físicos e químicos durante períodos críticos do ciclo biológico), que favorecem o desenvolvimento não só de comorbidades como obesidade, diabetes, hipertensão mas também podem favorecer a vulnerabilidade aos transtornos

psicopatológicos. Esse aumento na vulnerabilidade destas desordens pode ser decorrente de alteração dos sistemas regulatórios, como o serotoninérgico, o noradrenérgico, o dopaminérgico, o glutamatérgico e o gabaérgico, que estão intimamente conectados aos transtornos de ansiedade e depressão (Fraga e cols., 2014; Mlyniec e cols., 2015). Ainda neste sentido, Sivanathan e cols., sugeriram que a DH também altera a regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), por comprometer os receptores mineralocorticoides, glucocorticoides e moléculas de sinalização pro-inflamatória, e que conseqüentemente, favorecem o aumento das respostas fisiológicas ao estresse, em parte por suprimir a liberação de corticosterona (Sivanathan e cols., 2015). Outros autores já enfatizaram a importância do sistema GABAérgico na regulação precisa de núcleos encefálicos, dentre eles o HDM, e sua relação à respostas reativas durante o estresse, e ainda demonstraram que o comprometimento deste sistema favorece alterações fisiológicas e comportamentais frente a estes fatores estressores (Stotz-Potter e cols., 1996; Abreu e cols., 2014; Shekhar, 1993; Soltis & Dimicco, 1991a).

Apesar dos dados expostos acima, alguns autores observaram resultados divergentes entre a relação da obesidade e ansiedade, dentre eles podemos citar Warneke e cols, nos quais os efeitos crônicos da DH foram capazes de induzir a ansiedade apenas em ratos que passaram menos tempo explorando os braços abertos do LCE, e contraditoriamente a DH teve um possível efeito ansiolítico em fêmeas, neste mesmo teste (Warneke e cols., 2014). Em outro estudo conduzido por Sivanathan e cols., no qual ratas foram expostas cronicamente a DH (60% de lipídios), os resultados foram conflitantes, e apesar destes animais apresentarem comportamento do tipo ansiedade nos testes de transição claro/escuro e no campo aberto, não apresentarem este tipo de comportamento no teste do LCE, o que sugere que diferentes mecanismos de reatividade neuronal estão ativados nas diferentes metodologias de avaliação comportamental (Sivanathan e cols., 2015).

O neurotransmissor inibidor GABA é o principal no SNC de vertebrados, e apresenta-se amplamente distribuído nos neurônios (aproximadamente 40%), sendo capaz de ativar receptores ionotrópicos, por meio da abertura de canais de cloreto, promovendo a hiperpolarização da membrana neuronal (Franciolini & Petris, 1990). Diversos estudos farmacológicos já demonstraram que alterações no influxo de cloreto, mediada pela neurotransmissão GABAérgica, provocam alterações no

comportamento de ansiedade em modelos animais, estes dados estão em convergência aos estudos que demonstram que agentes facilitadores da absorção neuronal de cloreto geralmente produzem efeitos ansiolíticos e antidepressivos (Shekhar e cols., 1990; Shekhar, 1993; Malatynska e cols., 1995; Imamura & Prasad, 1998). Nossa hipótese, de que os animais induzidos a obesidade apresentam comportamento do tipo ansiedade, se baseia na premissa de que a obesidade possivelmente esteja comprometendo o sistema inibitório GABAérgico, como sugerido por Abreu e cols. A diminuição hipotalâmica de GABA, seja por comprometimento do influxo de cloreto, ou por comprometimento dos receptores, ou ainda por diminuição da liberação de vesículas, poderia ser um importante fator na susceptibilidade ao desenvolvimento dos transtornos de ansiedade (Abreu e cols., 2014; Imamura & Prasad, 1998). Nossa hipótese acerca do envolvimento do HDM nestes transtornos está relacionada ao fato de que a administração de agonista GABA<sub>A</sub> muscimol neste núcleo age enquanto ansiolítico em ratos submetidos ao teste do LCE, e os antagonistas GABA<sub>A</sub>, bicuculina e picrotoxina, promovem um efeito oposto (ansiogênico), além disso o bloqueio deste receptor no HDM aumenta a ansiedade no teste de conflito, e ainda, que a obesidade crônica provoca um aumento da reatividade ao estresse (aumento da PAM e FC) (Shekhar e cols., 1990; Shekhar, 1993; Malatynska e cols., 1995; Imamura & Prasad, 1998).

Outros estudos sugerem ainda uma forte correlação entre os comprometimentos do SNC e a obesidade, devido ao fato desta patologia promover o desenvolvimento de inflamação crônica de baixo grau em tecidos periféricos, que promove também um estímulo ao processo inflamatório no SNC, inclusive em importantes núcleos hipotalâmicos. Esta inflamação gera uma resposta imunológica no SNC, que favorece o desenvolvimento da hipertrofia e hiperplasia dos astrócitos e das células da glia (atrogliose reativa) (Buckman e cols., 2013; Gao e cols., 2014; Thaler e cols., 2012; Hsueh e cols., 2009). Estas alterações anatômicas e injúrias encefálicas, decorrentes da administração crônica da DH, em particular no HDM, comprometem os astrócitos, que estão envolvidos em processo sinápticos e de reciclagem de neurotransmissores, bem como as células da glia, que gera uma resposta reativa capaz de inativar o processo de difusão de pequenas moléculas, dentre elas glutamato, GABA e catecolaminas (Ortinski e cols., 2010; Bak e cols., 2006; Walls e cols., 2015). Um crescente número de evidências sugere que as

neuropatologias, tais como Parkinson, Alzheimer, AVE e injúrias encefálicas traumáticas, relacionam-se a um comprometimento do funcionamento do ciclo glutamato-glutamina, e todas estas condições associam-se ao aparente desenvolvimento da astrogliose reativa (Ortinski e cols., 2010; Seifert e cols., 2006). Essas alterações sustentam nossos resultados, de que animais induzidos à obesidade apresentam uma possível alteração GABAérgica, sendo esta a provável causa do aumento da reatividade a fatores estressores e das alterações comportamentais do tipo ansiedade observadas no LTE.

Apesar dos estudos descreverem o muscimol como um possível ansiolítico, (Imamura & Prasad, 1998), em nosso trabalho, o tratamento com este agonista GABA<sub>A</sub> foi ineficiente em diminuir as respostas de ansiedade e medo inato dos animais controle e obesos, o que foi demonstrado por não ter sido observado uma redução no tempo de latência dos animais expostos ao braço fechado. No entanto, o tratamento com muscimol apresentou-se eficiente em controlar o comportamento do tipo pânico tanto dos animais controle quanto dos animais obesos, promovendo um aumento do tempo de fuga, o que significa que os animais tratados apresentam uma redução do comportamento ao medo/ameaça (de locais altos e abertos) quando expostos ao braço aberto no LTE. Surpreendentemente, os animais obesos tratados com muscimol, quando comparados ao grupo obeso não tratados com muscimol, apresentaram um aumento no tempo de latência no braço fechado, o que significa que o muscimol poderia aumentar o comportamento do tipo ansiedade nestes animais, porém, em estudo realizado por Abreu e cols., foi observado que animais obesos, quando tratados com este agonista não apresentaram redução da PAM, e ainda apresentaram aumento da FC após a microinjeção bilateral de muscimol no HDM, o que é justificado pelo comprometimento da homeostase GABAérgica no HDM (Abreu e cols., 2014). Contrariamente à ineficiência do muscimol em reduzir o comportamento do tipo ansiedade, este agonista se mostrou eficiente na redução do comportamento do tipo pânico em animais obesos expostos no LTE. No entanto, a reexposição destes animais após 24 horas no LTE demonstrou uma diminuição significativa do tempo de latência no braço aberto, o que demonstra que após 24 horas do tratamento com muscimol, o animal apresentou um comportamento do tipo pânico. Este resultado reforça nossa ideia de que o sistema GABAérgico apresenta-se comprometido em animais obesos, o que possivelmente compromete o limiar excitatório no HDM,

favorecendo um possível predomínio glutamatérgico e consequente desenvolvimento de transtornos de pânico (Shekhar e cols., 2006).

Diversos estudos já demonstraram que o agonista GABA<sub>A</sub>, muscimol é eficiente em reduzir o aumento das respostas cardiovascular, como taquicardia e hipertensão, mediante estresse agudo (Dimicco e cols., 1996; Stotz-Potter e cols., 1996; Soltis & Dimicco, 1991b; Soltis & Dimicco, 1991a) e também de controlar o comportamento de ansiedade (Shekhar e cols., 1990; Shekhar, 1993) No entanto, nosso intuito foi investigar se o tratamento com este agonista em animais induzidos à obesidade seria capaz de reduzir o comportamento do tipo ansiedade e do tipo pânico, e ainda avaliar se este efeito poderia comprometer a memória adquirida na esquiva inibitória e alterar os parâmetros de latência na reexposição após 24 horas na fuga. Em estudo realizado por Nascimento e cols., a microinjeção de 0,5 e 1,0 nmol de muscimol no HDM de ratos não foi eficiente em reduzir o comportamento do tipo ansiedade em animais submetido ao teste no LTE, contrariamente, observou-se que o muscimol é capaz de reduzir o comportamento do tipo pânico. A administração de 1,0nmol comprometeu a atividade locomotora dos animais (Nascimento e cols., 2010). Nossos resultados convergem nesse mesmo sentido em relação aos efeitos panicolíticos do muscimol, já que os animais obesos e controle tratados com este agonista demonstraram um aumento no tempo de latência durante a realização da fuga no LTE. Além disso, nossos dados não demonstram comprometimento em relação a atividade lomocotora dos animais tratados, o que sugere que este efeito panicolítico não relaciona-se com a letargia gerada pela administração do muscimol no HDM. Supreendentemente, o muscimol não só se mostrou ineficiente em reduzir o comportamento do tipo ansiedade nos animais obesos, como também aumento o tempo de latência durante a esquiva inibitória. Já é bem descrito que o HDM é uma região tónicamente regulada por inibição GABAérgica e projeções excitatórias glutamatérgicas (Dimicco e cols., 2002), e o comprometimento desta regulação, seja por diminuição da liberação de GABA, por alteração na sensibilidade do receptor GABA<sub>A</sub>R, ou por processo inflamatórios, poderiam causar uma redução na ação do muscimol. Em estudo realizado por Shekhar e cols., animais com inibição crônica da síntese de GABA por tratamento crônico com L-aliglicina, apresentaram uma resposta panicogênica robusta, semelhantes a reações defensivas de respostas inatas às ameaças ambientais (Shekhar & Keim, 1997). Neste sentido, nossos resultados demonstram que o

muscimol foi ineficiente em conter o comportamento do tipo ansiedade nos animais obesos, e ainda favoreceu a contraregulação excitatória glutamatérgica, aumentando o comportamento do tipo ansiedade, demonstrado pelo aumento da latência no braço fechado. Corroborando com este dado, observamos que o tempo de latência da fuga na reexposição após 24 horas destes animais tratados com muscimol foi menor, sugerindo que o efeito panicolítico decorrente do tratamento com muscimol não se sustentou após este período e aparentemente agravou o predomínio excitatório do tônus glutamatérgico no HDM deste animais.

A desinibição do HDM por meio do antagonista GABA<sub>A</sub> BMI comprometeu o aprendizado dos animais controle, e foi eficiente em aumentar o tempo de latência da esQUIVA inibitória na primeira exposição ao aparato (Linha de Base), quando comparados ao grupo obeso. Neste último, não foi observado o prejuízo da capacidade de aprendizado, o que indica que estes animais apresentam uma provável resistência à ação da BMI, possivelmente por este ser um antagonista GABAérgico, que como sugerimos, aparentemente este sistema apresenta-se comprometido nestes animais. Esta resistência à ação da BMI já foi descrita por Abreu e cols., em animais obesos que apresentaram um aumento exacerbado e de curto período da FC após o tratamento com BMI no HDM, efeito este, que não é sustentado da mesma forma como em animais controle submetidos ao teste de estresse por jato de ar (Abreu e cols., 2014). Apesar da BMI interferir na capacidade de aprendizado dos animais controle, a reexposição destes animais após 24 horas no braço fechado do LTE provocou um aumento no tempo de latência neste braço, o que corrobora com a ideia de que o medo intensifica o comportamento do tipo ansiedade (Mochcovitch e cols., 2014).

Vários estudos já demonstraram a eficiência da desinibição GABAérgica do HDM, por meio de antagonistas e lesões nesta região, no envolvimento das alterações cardiovasculares, bem como nas alterações comportamentais semelhantes às observadas em ataques de pânico (Johnson & Shekhar, 2006; Johnson & Shekhar, 2012; Shekhar, 1993; Shekhar e cols., 1996; Shekhar e cols., 2011; Silveira & Graeff, 1992). Nossos resultados demonstraram que a administração de antagonista GABA<sub>A</sub> BMI, em animais controle foi eficiente em comprometer o aprendizado durante a esQUIVA inibitória, bem como de induzir o do tipo ansiedade, em contrapartida, este antagonista não impediu o aprendizado durante as tentativas de esQUIVA inibitória dos

animais obesos, provavelmente pelo comprometimento GABAérgico destes animais, e consequente predomínio do tônus excitatório, a BMI foi capaz apenas de subestimular (ou excitar por um curto período de tempo) o neurônios do HDM. Em compensação, apesar do comprometimento de aprendizagem dos animais controle tratados com BMI no LTE, estes apresentaram uma aumento no tempo de latência no braço fechado na reexposição após 24 horas, o que reforça a ideia de que a esquiva inibitória de fato pode ser aprendida (em sequências de exposição ao braço fechado do LTE) e relacionar-se com a consolidação da memória, com validado por Graeff e Zangrossi (Graeff e cols., 1998; Pobbe e cols., 2014; Shekhar, 1993; Shekhar e cols., 1996; Shekhar e cols., 2011; Silveira & Graeff, 1992).

## 6 – CONCLUSÃO

Estes resultados indicam que a obesidade induzida por DH durante 9 semanas foi capaz de favorecer o desenvolvimento do comportamento do tipo ansiedade, mas não do tipo pânico nos animais. A tratamento com o agonista muscimol se mostrou ineficaz enquanto possível fármaco ansiolítico, porém surtiu efeito na melhoria do comportamento aversivo. A BMI não foi capaz de induzir o comportamento do tipo pânico nos animais, mas foi eficiente em induzir o comportamento do tipo ansiedade e de comprometer o aprendizado nos animais controle. Entretanto a BMI não foi capaz de induzir este comportamento do tipo ansiedade, em animais obesos quando comparado aos animais obesos não tratados (veículo), confirmando que o sistema GABAérgico no HDM está comprometido. Tais resultados reforçam os achados acerca das alterações neste núcleo hipotalâmico na regulação de projeções inibitórias em animais obesos, sugerindo a existência de uma forte relação entre esta patologia e o aumento da susceptibilidade aos transtornos de ansiedade.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABILDGAARD A., LUND S. & HOUGAARD K.S. (2014) Chronic high-fat diet increases acute neuroendocrine stress response independently of prenatal dexamethasone treatment in male rats. *Acta Neuropsychiatr.* **26**, 8-18.
- ABILDGAARD A., SOLSKOV L., VOLKE V., HARVEY B.H., LUND S. & WEGENER G. (2011) A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. *Psychoneuroendocrinology* **36**, 623-633.
- ABREU A.R., DE ABREU A.R., SANTOS L.T., DE SOUZA A.A., DA SILVA L.G.J., CHIANCA D.A., Jr. & DE MENEZES R.C. (2014) Blunted GABA-mediated inhibition within the dorsomedial hypothalamus potentiates the cardiovascular response to emotional stress in rats fed a high-fat diet. *Neuroscience* **262**, 21-30.
- AMRI R., BORDEIANOU L.G., SYLLA P. & BERGER D.L. (2014) Obesity, outcomes and quality of care: body mass index increases the risk of wound-related complications in colon cancer surgery. *Am.J.Surg.* **207**, 17-23.
- AWAD A.B., BERNARDIS L.L. & FINK C.S. (1990) Failure to demonstrate an effect of dietary fatty acid composition on body weight, body composition and parameters of lipid metabolism in mature rats. *J.Nutr.* **120**, 1277-1282.
- BAK L.K., SCHOUSBOE A. & WAAGEPETERSEN H.S. (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J.Neurochem.* **98**, 641-653.
- BECKETT S.R., DUXON M.S., ASPLEY S. & MARSDEN C.A. (1997) Central c-fos expression following 20kHz/ultrasound induced defence behaviour in the rat. *Brain Res.Bull.* **42**, 421-426.
- BERGADO-ACOSTA J.R., MULLER I., RICHTER-LEVIN G. & STORK O. (2014) The GABA-synthetic enzyme GAD65 controls circadian activation of conditioned fear pathways. *Behav.Brain Res.* **260**, 92-100.
- BERNARDIS L.L. & PATTERSON B.D. (1968) Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J.Endocrinol.* **40**, 527-528.
- BILBO S.D. & TSANG V. (2010) Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *FASEB J.* **24**, 2104-2115.
- BUCKMAN L.B., THOMPSON M.M., MORENO H.N. & ELLACOTT K.L. (2013) Regional astrogliosis in the mouse hypothalamus in response to obesity. *J.Comp Neurol.* **521**, 1322-1333.
- BUETTNER R., PARHOFER K.G., WOENCKHAUS M., WREDE C.E., KUNZ-SCHUGHART L.A., SCHOLMERICH J. & BOLLHEIMER L.C. (2006) Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J.Mol.Endocrinol.* **36**, 485-501.
- CALDER P.C., COSTA-ROSA L.F. & CURI R. (1995) Effects of feeding lipids of different fatty acid compositions upon rat lymphocyte proliferation. *Life Sci.* **56**, 455-463.

- CANTERAS N.S. (2002) The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **71**, 481-491.
- CATTA-PRETA M., MARTINS M.A., CUNHA BRUNINI T.M., MENDES-RIBEIRO A.C., MANDARIM-DE-LACERDA C.A. & AGUILA M.B. (2012) Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. *Nutrition* **28**, 212-219.
- CHONGSA W., RADENAHMAD N. & JANSAKUL C. (2014) Six weeks oral gavage of a *Phyllanthus acidus* leaf water extract decreased visceral fat, the serum lipid profile and liver lipid accumulation in middle-aged male rats. *J.Ethnopharmacol.* **155**, 396-404.
- COSTA R.R., VILLELA N.R., SOUZA M., BOA B.C., CYRINO F.Z., SILVA S.V., LISBOA P.C., MOURA E.G., BARJA-FIDALGO T.C. & BOUSKELA E. (2011) High fat diet induces central obesity, insulin resistance and microvascular dysfunction in hamsters. *Microvasc.Res.* **82**, 416-422.
- DA SILVA E.S., POLTRONIERI S.C., NASCIMENTO J.O., ZANGROSSI H., Jr. & VIANA M.B. (2011) Facilitation of 5-HT(2A/2C)-mediated neurotransmission in the ventromedial hypothalamic nucleus decreases anxiety in the elevated T-maze. *Behav.Brain Res.* **216**, 692-698.
- DE MENEZES R.C., ZARETSKY D.V., FONTES M.A. & DIMICCO J.A. (2006) Microinjection of muscimol into caudal periaqueductal gray lowers body temperature and attenuates increases in temperature and activity evoked from the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res.* **1092**, 129-137.
- DE MENEZES R.C., ZARETSKY D.V., SARKAR S., FONTES M.A. & DIMICCO J.A. (2008) Microinjection of muscimol into the periaqueductal gray suppresses cardiovascular and neuroendocrine response to air jet stress in conscious rats. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **295**, R881-R890
- DE SOUZA C.T., ARAUJO E.P., BORDIN S., ASHIMINE R., ZOLLNER R.L., BOSCHERO A.C., SAAD M.J. & VELLOSO L.A. (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* **146**, 4192-4199.
- DELANY J.P., WINDHAUSER M.M., CHAMPAGNE C.M. & BRAY G.A. (2000) Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am.J.Clin.Nutr.* **72**, 905-911.
- DIMICCO J.A., SAMUELS B.C., ZARETSKAIA M.V. & ZARETSKY D.V. (2002) The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **71**, 469-480.
- DIMICCO J.A., SARKAR S., ZARETSKAIA M.V. & ZARETSKY D.V. (2006) Stress-induced cardiac stimulation and fever: common hypothalamic origins and brainstem mechanisms. *Auton.Neurosci.* **126-127**, 106-119.
- DIMICCO J.A., STOTZ-POTTER E.H., MONROE A.J. & MORIN S.M. (1996) Role of the dorsomedial hypothalamus in the cardiovascular response to stress. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **23**, 171-176.
- ETKIN A. (2010) Functional neuroanatomy of anxiety: a neural circuit perspective. *Curr.Top.Behav.Neurosci.* **2**, 251-277.
- FONTES M.A., XAVIER C.H., DE MENEZES R.C. & DIMICCO J.A. (2011) The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience* **184**, 64-74.

- FRAGA M.C., DE MOURA E.G., DA SILVA L.N., LISBOA P.C., DE O.E., SILVA J.O., CLAUDIO-NETO S., FILGUEIRAS C.C., ABREU-VILLACA Y. & MANHAES A.C. (2014) Anxiety-like, novelty-seeking and memory/learning behavioral traits in male Wistar rats submitted to early weaning. *Physiol Behav.* **124**, 100-106.
- FRANCIOLINI F. & PETRIS A. (1990) Chloride channels of biological membranes. *Biochim.Biophys.Acta* **1031**, 247-259.
- FREITAS R.L., URIBE-MARINO A., CASTIBLANCO-URBINA M.A., ELIAS-FILHO D.H. & COIMBRA N.C. (2009) GABA(A) receptor blockade in dorsomedial and ventromedial nuclei of the hypothalamus evokes panic-like elaborated defensive behaviour followed by innate fear-induced antinociception. *Brain Res.* **1305**, 118-131.
- GAO Y., OTTAWAY N., SCHRIEVER S.C., LEGUTKO B., GARCIA-CACERES C., DE LA FUENTE E., MERGEN C., BOUR S., THALER J.P., SEELEY R.J., FILOSA J., STERN J.E., PEREZ-TILVE D., SCHWARTZ M.W., TSCHOP M.H. & YI C.X. (2014) Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. *Glia* **62**, 17-25.
- GRAEFF F.G., NETTO C.F. & ZANGROSSI H., Jr. (1998) The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **23**, 237-246.
- HANDLEY S.L. & MITHANI S. (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **327**, 1-5.
- HARIRI N., GOUGEON R. & THIBAUT L. (2010) A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. *Nutr.Res.* **30**, 632-643.
- HARIRI N. & THIBAUT L. (2010) High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr.Res.Rev.* **23**, 270-299.
- HOFFMAN D.L., DUKES E.M. & WITTCHEN H.U. (2008) Human and economic burden of generalized anxiety disorder. *Depress.Anxiety.* **25**, 72-90.
- HOLM M.M., NIETO-GONZALEZ J.L., VARDYA I., HENNINGSSEN K., JAYATISSA M.N., WIBORG O. & JENSEN K. (2011) Hippocampal GABAergic dysfunction in a rat chronic mild stress model of depression. *Hippocampus* **21**, 422-433.
- HSUCHOU H., HE Y., KASTIN A.J., TU H., MARKADAKIS E.N., ROGERS R.C., FOSSIER P.B. & PAN W. (2009) Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain* **132**, 889-902.
- IKEMOTO S., THOMPSON K.S., TAKAHASHI M., ITAKURA H., LANE M.D. & EZAKI O. (1995) High fat diet-induced hyperglycemia: prevention by low level expression of a glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 3096-3099.
- IMAMURA M. & PRASAD C. (1998) Increased GABA-gated chloride ion influx in the hypothalamus of low-anxiety rats. *Physiol Behav.* **64**, 415-417.
- INGLEFIELD J.R., SCHWARZKOPF S.B. & KELLOGG C.K. (1994) Alterations in behavioral responses to stressors following excitotoxin lesions of dorsomedial hypothalamic regions. *Brain Res.* **633**, 151-161.

- JARDIM M.C. & GUIMARAES F.S. (2001) GABAergic and glutamatergic modulation of exploratory behavior in the dorsomedial hypothalamus. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **69**, 579-584.
- JARDIM M.C., NOGUEIRA R.L., GRAEFF F.G. & NUNES-DE-SOUZA R.L. (1999) Evaluation of the elevated T-maze as an animal model of anxiety in the mouse. *Brain Res.Bull.* **48**, 407-411.
- JAUCH-CHARA K. & OLTMANN S.K.M. (2014) Obesity--a neuropsychological disease? Systematic review and neuropsychological model. *Prog.Neurobiol.* **114**, 84-101.
- JOHNSON P.L. & SHEKHAR A. (2006) Panic-prone state induced in rats with GABA dysfunction in the dorsomedial hypothalamus is mediated by NMDA receptors. *J.Neurosci.* **26**, 7093-7104.
- JOHNSON P.L. & SHEKHAR A. (2012) An animal model of panic vulnerability with chronic disinhibition of the dorsomedial/perifornical hypothalamus. *Physiol Behav.* **107**, 686-698.
- JUDEX S., LUU Y.K., OZCIVICI E., ADLER B., LUBLINSKY S. & RUBIN C.T. (2010) Quantification of adiposity in small rodents using micro-CT. *Methods* **50**, 14-19.
- KEIM S.R. & SHEKHAR A. (1996) The effects of GABAA receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats. *Brain Res.* **739**, 46-51.
- KIEN C.L., BUNN J.Y. & UGRASBUL F. (2005) Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *Am.J.Clin.Nutr.* **82**, 320-326.
- KINDT M. (2014) A behavioural neuroscience perspective on the aetiology and treatment of anxiety disorders. *Behav.Res.Ther.* **62**, 24-36.
- LAI M., CHANDRASEKERA P.C. & BARNARD N.D. (2014) You are what you eat, or are you? The challenges of translating high-fat-fed rodents to human obesity and diabetes. *Nutr.Diabetes* **4**, e135
- LEE P.Y., KIM W., CHAE J.H., SEO O.K., FRICK K.D. & WOO J.M. (2014) Impairment of work productivity in panic disorder patients. *J.Affect.Disord.* **157**, 60-65.
- LISSNER L., LEVITSKY D.A., STRUPP B.J., KALKWARF H.J. & ROE D.A. (1987) Dietary fat and the regulation of energy intake in human subjects. *Am.J.Clin.Nutr.* **46**, 886-892.
- LISSNER L., SJOBERG A., SCHUTZE M., LAPIDUS L., HULTHEN L. & BJORKELUND C. (2008) Diet, obesity and obesogenic trends in two generations of Swedish women. *Eur.J.Nutr.* **47**, 424-431.
- LOCKE A.E., KAHALI B., BERNDT S.I., JUSTICE A.E., PERS T.H., DAY F.R., POWELL C., VEDANTAM S., BUCHKOVICH M.L., YANG J., CROTEAU-CHONKA D.C., ESKO T., FALL T., FERREIRA T., GUSTAFSSON S., KUTALIK Z., LUAN J., MAGI R., RANDALL J.C., WINKLER T.W., WOOD A.R., WORKALEMAHU T., FAUL J.D., SMITH J.A., HUA Z.J., ZHAO W., CHEN J., FEHRMANN R., HEDMAN A.K., KARJALAINEN J., SCHMIDT E.M., ABSHER D., AMIN N., ANDERSON D., BEEKMAN M., BOLTON J.L., BRAGG-GRESHAM J.L., BUYSKE S., DEMIRKAN A., DENG G., EHRET G.B., FEENSTRA B., FEITOSA M.F., FISCHER K., GOEL A., GONG J., JACKSON A.U., KANONI S., KLEBER M.E., KRISTIANSSON K., LIM U., LOTAY V., MANGINO M., MATEO L., MEDINA-GOMEZ C., MEDLAND S.E., NALLS M.A., PALMER C.D., PASKO D., PECHLIVANIS S., PETERS M.J., PROKOPENKO I., SHUNGIN D., STANCAKOVA A., STRAWBRIDGE R.J., JU S.Y., TANAKA T., TEUMER A., TROMPET S., VAN DER LAAN S.W., VAN S.J., VAN VLIET-OSTAPTCHOUK J.V., WANG Z., YENGO L., ZHANG W., ISAACS A., ALBRECHT E., ARNLOV J., ARSCOTT G.M., ATTWOOD A.P.,

BANDINELLI S., BARRETT A., BAS I.N., BELLIS C., BENNETT A.J., BERNE C., BLAGIEVA R., BLUHER M., BOHRINGER S., BONNYCASTLE L.L., BOTTCHER Y., BOYD H.A., BRUINENBERG M., CASPERSEN I.H., IDA CHEN Y.D., CLARKE R., DAW E.W., DE CRAEN A.J., DELGADO G., DIMITRIOU M., DONEY A.S., EKLUND N., ESTRADA K., EURY E., FOLKERSEN L., FRASER R.M., GARCIA M.E., GELLER F., GIEDRAITIS V., GIGANTE B., GO A.S., GOLAY A., GOODALL A.H., GORDON S.D., GORSKI M., GRABE H.J., GRALLERT H., GRAMMER T.B., GRASSLER J., GRONBERG H., GROVES C.J., GUSTO G., HAESSLER J., HALL P., HALLER T., HALLMANS G., HARTMAN C.A., HASSINEN M., HAYWARD C., HEARD-COSTA N.L., HELMER Q., HENGSTENBERG C., HOLMEN O., HOTTENGA J.J., JAMES A.L., JEFF J.M., JOHANSSON A., JOLLEY J., JULIUSDOTTIR T., KINNUNEN L., KOENIG W., KOSKENVUO M., KRATZER W., LAITINEN J., LAMINA C., LEANDER K., LEE N.R., LICHTNER P., LIND L., LINDSTROM J., SIN L.K., LOBBENS S., LORBEER R., LU Y., MACH F., MAGNUSSON P.K., MAHAJAN A., MCARDLE W.L., MCLACHLAN S., MENNI C., MERGER S., MIHAILOV E., MILANI L., MOAYYERI A., MONDA K.L., MORKEN M.A., MULAS A., MULLER G., MULLER-NURASYID M., MUSK A.W., NAGARAJA R., NOTHEN M.M., NOLTE I.M., PILZ S., RAYNER N.W., RENSTROM F., RETTIG R., RIED J.S., RIPKE S., ROBERTSON N.R., ROSE L.M., SANNA S., SCHARNAGL H., SCHOLTENS S., SCHUMACHER F.R., SCOTT W.R., SEUFFERLEIN T., SHI J., VERNON S.A., SMOLONSKA J., STANTON A.V., STEINTHORSDDOTTIR V., STIRRUPS K., STRINGHAM H.M., SUNDSTROM J., SWERTZ M.A., SWIFT A.J., SYVANEN A.C., TAN S.T., TAYO B.O., THORAND B., THORLEIFSSON G., TYRER J.P., UH H.W., VANDENPUT L., VERHULST F.C., VERMEULEN S.H., VERWEIJ N., VONK J.M., WAITE L.L., WARREN H.R., WATERWORTH D., WEEDON M.N., WILKENS L.R., WILLENBORG C., WILSGAARD T., WOJCZYNSKI M.K., WONG A., WRIGHT A.F., ZHANG Q., BRENNAN E.P., CHOI M., DASTANI Z., DRONG A.W., ERIKSSON P., FRANCO-CERECEDA A., GADIN J.R., GHARAVI A.G., GODDARD M.E., HANDSAKER R.E., HUANG J., KARPE F., KATHIRESAN S., KEILDSON S., KIRYLUK K., KUBO M., LEE J.Y., LIANG L., LIFTON R.P., MA B., MCCARROLL S.A., MCKNIGHT A.J., MIN J.L., MOFFATT M.F., MONTGOMERY G.W., MURABITO J.M., NICHOLSON G., NYHOLT D.R., OKADA Y., PERRY J.R., DORAJOO R., REINMAA E., SALEM R.M., SANDHOLM N. & SCOTT R.A. (2015) Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* **518**, 197-206.

MALATYNSKA E., DE L., I, ALLEN D. & YAMAMURA H.I. (1995) Effects of amitriptyline on GABA-stimulated. *Brain Res.Bull.* **37**, 53-59.

MALTA D.C., ANDRADE S.C., CLARO R.M., BERNAL R.T. & MONTEIRO C.A. (2014) Trends in prevalence of overweight and obesity in adults in 26 Brazilian state capitals and the Federal District from 2006 to 2012. *Rev.Bras.Epidemiol.* **17 Suppl 1**, 267-276.

MARTINEZ R.C., CARVALHO-NETTO E.F., AMARAL V.C., NUNES-DE-SOUZA R.L. & CANTERAS N.S. (2008) Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. *Behav.Brain Res.* **192**, 185-190.

MATHER A.A., COX B.J., ENNS M.W. & SAREEN J. (2009) Associations of obesity with psychiatric disorders and suicidal behaviors in a nationally representative sample. *J.Psychosom.Res.* **66**, 277-285.

MILANSKI M., DEGASPERI G., COOPE A., MORARI J., DENIS R., CINTRA D.E., TSUKUMO D.M., ANHE G., AMARAL M.E., TAKAHASHI H.K., CURI R., OLIVEIRA H.C., CARVALHEIRA J.B., BORDIN S., SAAD M.J. & VELLOSO L.A. (2009) Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J.Neurosci.* **29**, 359-370.

MINEKA S. & ZINBARG R. (2006) A contemporary learning theory perspective on the etiology of anxiety disorders: it's not what you thought it was. *Am.Psychol.* **61**, 10-26.

- MITCHELL N.S., CATENACCI V.A., WYATT H.R. & HILL J.O. (2011) Obesity: overview of an epidemic. *Psychiatr.Clin.North Am.* **34**, 717-732.
- MITCHELL S. & SHAW D. (2014) The worldwide epidemic of female obesity. *Best.Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol.*
- MLYNIK K., GAWEL M., DOBOSZEWSKA U., STAROWICZ G., PYTKA K., DAVIES C.L. & BUDZISZEWSKA B. (2015) Essential elements in depression and anxiety. Part II. *Pharmacol.Rep.* **67**, 187-194.
- MOCHCOVITCH M.D., DA ROCHA FREIRE R.C., GARCIA R.F. & NARDI A.E. (2014) A systematic review of fMRI studies in generalized anxiety disorder: evaluating its neural and cognitive basis. *J.Affect.Disord.* **167**, 336-342.
- MOHLER H. (2012) The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* **62**, 42-53.
- MOUSSAVI N., GAVINO V. & RECEVEUR O. (2008) Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity (Silver.Spring)* **16**, 7-15.
- NASCIMENTO J.O., ZANGROSSI H., Jr. & VIANA M.B. (2010) Effects of reversible inactivation of the dorsomedial hypothalamus on panic- and anxiety-related responses in rats. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **43**, 869-873.
- NG M., FLEMING T., ROBINSON M., THOMSON B., GRAETZ N., MARGONO C., MULLANY E.C., BIRYUKOV S., ABBAFATI C., ABERA S.F., ABRAHAM J.P., ABU-RMEILEH N.M., ACHOKI T., ALBUHAIRAN F.S., ALEMU Z.A., ALFONSO R., ALI M.K., ALI R., GUZMAN N.A., AMMAR W., ANWARI P., BANERJEE A., BARQUERA S., BASU S., BENNETT D.A., BHUTTA Z., BLORE J., CABRAL N., NONATO I.C., CHANG J.C., CHOWDHURY R., COURVILLE K.J., CRIQUI M.H., CUNDIFF D.K., DABHADKAR K.C., DANDONA L., DAVIS A., DAYAMA A., DHARMARATNE S.D., DING E.L., DURRANI A.M., ESTEGHAMATI A., FARZADFAR F., FAY D.F., FEIGIN V.L., FLAXMAN A., FOROUZANFAR M.H., GOTO A., GREEN M.A., GUPTA R., HAFEZI-NEJAD N., HANKEY G.J., HAREWOOD H.C., HAVMOELLER R., HAY S., HERNANDEZ L., HUSSEINI A., IDRISOV B.T., IKEDA N., ISLAMI F., JAHANGIR E., JASSAL S.K., JEE S.H., JEFFREYS M., JONAS J.B., KABAGAMBE E.K., KHALIFA S.E., KENGNE A.P., KHADER Y.S., KHANG Y.H., KIM D., KIMOKOTI R.W., KINGE J.M., KOKUBO Y., KOSEN S., KWAN G., LAI T., LEINSALU M., LI Y., LIANG X., LIU S., LOGROSCINO G., LOTUFO P.A., LU Y., MA J., MAINOO N.K., MENSAH G.A., MERRIMAN T.R., MOKDAD A.H., MOSCHANDREAS J., NAGHAVI M., NAHEED A., NAND D., NARAYAN K.M., NELSON E.L., NEUHOUSER M.L., NISAR M.I., OHKUBO T., OTI S.O., PEDROZA A., PRABHAKARAN D., ROY N., SAMPSON U., SEO H., SEPANLOU S.G., SHIBUYA K., SHIRI R., SHIUE I., SINGH G.M., SINGH J.A., SKIRBEKK V., STAPELBERG N.J., STURUA L., SYKES B.L., TOBIAS M., TRAN B.X., TRASANDE L., TOYOSHIMA H., VAN d., V, VASANKARI T.J., VEERMAN J.L., VELASQUEZ-MELENDEZ G., VLASSOV V.V., VOLLSET S.E., VOS T., WANG C., WANG X., WEIDERPASS E., WERDECKER A., WRIGHT J.L., YANG Y.C., YATSUYA H., YOON J., YOON S.J., ZHAO Y., ZHOU M., ZHU S., LOPEZ A.D., MURRAY C.J. & GAKIDOU E. (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**, 766-781.
- ORTINSKI P.I., DONG J., MUNGENAST A., YUE C., TAKANO H., WATSON D.J., HAYDON P.G. & COULTER D.A. (2010) Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nat.Neurosci.* **13**, 584-591.

- PARK Y.H., LEE J.K., KIM K.M., KOOK H.R., LEE H., KIM K.B., LEE S., BYUN S.S. & LEE S.E. (2014) Visceral obesity in predicting oncologic outcomes of localized renal cell carcinoma. *J.Urol.* **192**, 1043-1049.
- PAXINOS G., WATSON C., PENNISI M. & TOPPLE A. (1985) Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J.Neurosci.Methods* **13**, 139-143.
- PEREIRA-LANCHA L.O., CAMPOS-FERRAZ P.L. & LANCHA A.H., Jr. (2012) Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. *Diabetes Metab Syndr.Obes.* **5**, 75-87.
- PHELPS E.A. & LEDOUX J.E. (2005) Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* **48**, 175-187.
- PINHEIRO S.H., ZANGROSSI H., Jr., DEL-BEN C.M. & GRAEFF F.G. (2007) Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. *An.Acad.Bras.Cienc.* **79**, 71-85.
- POBBE R.L., LOPES M.A., VASCONCELOS A.T., YAMASHITA P.S., DE BORTOLI V.C. & ZANGROSSI H. (2014) Influence of procedural variables on rat inhibitory avoidance and escape behaviors generated by the elevated T-maze. *Behav.Brain Res.* **273**, 45-51.
- POCOCK J.M. & KETTENMANN H. (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* **30**, 527-535.
- ROSINI T.C., SILVA A.S. & MORAES C. (2012) Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev.Assoc.Med.Bras.* **58**, 383-387.
- RYAN K.K., WOODS S.C. & SEELEY R.J. (2012) Central nervous system mechanisms linking the consumption of palatable high-fat diets to the defense of greater adiposity. *Cell Metab* **15**, 137-149.
- SAJDYK T.J., KATNER J.S. & SHEKHAR A. (1997) Monoamines in the dorsomedial hypothalamus of rats following exposure to different tests of "anxiety". *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* **21**, 193-209.
- SAMUELS L.T., GILMORE R.C. & REINECKE R.M. (1948) The effect of previous diet on the ability of animals to do work during subsequent fasting. *J.Nutr.* **36**, 639-651.
- SANSON L.T. & CAROBREZ A.P. (1999) Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T-maze model of anxiety. *Behav.Brain Res.* **101**, 59-64.
- SASAKI A., DE V.W., SIVANATHAN S., ST-CYR S. & MCGOWAN P.O. (2014) Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. *Neuroscience* **272**, 92-101.
- SCHWARTZ M.W. & PORTE D., Jr. (2005) Diabetes, obesity, and the brain. *Science* **307**, 375-379.
- SEIFERT G., SCHILLING K. & STEINHAUSER C. (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat.Rev.Neurosci.* **7**, 194-206.
- SERGIO T.O., SPIACCI A., Jr. & ZANGROSSI H., Jr. (2014) Effects of dorsal periaqueductal gray. *Psychoneuroendocrinology* **49**, 321-330.

- SHEKHAR A. (1993) GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures. *Brain Res.* **627**, 9-16.
- SHEKHAR A., HINGTGEN J.N. & DIMICCO J.A. (1990) GABA receptors in the posterior hypothalamus regulate experimental anxiety in rats. *Brain Res.* **512**, 81-88.
- SHEKHAR A., JOHNSON P.L., FITZ S.D., NAKAZATO A., CHAKI S., STECKLER T. & SCHMIDT M. (2011) A selective, non-peptide CRF receptor 1 antagonist prevents sodium lactate-induced acute panic-like responses. *Int.J.Neuropsychopharmacol.* **14**, 355-365.
- SHEKHAR A., JOHNSON P.L., SAJDYK T.J., FITZ S.D., KEIM S.R., KELLEY P.E., GEHLERT D.R. & DIMICCO J.A. (2006) Angiotensin-II is a putative neurotransmitter in lactate-induced panic-like responses in rats with disruption of GABAergic inhibition in the dorsomedial hypothalamus. *J.Neurosci.* **26**, 9205-9215.
- SHEKHAR A. & KEIM S.R. (1997) The circumventricular organs form a potential neural pathway for lactate sensitivity: implications for panic disorder. *J.Neurosci.* **17**, 9726-9735.
- SHEKHAR A., KEIM S.R., SIMON J.R. & MCBRIDE W.J. (1996) Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **55**, 249-256.
- SILVA M.S., PEREIRA B.A., CESPEDES I.C., NASCIMENTO J.O., BITTENCOURT J.C. & VIANA M.B. (2014) Dorsomedial hypothalamus CRF type 1 receptors selectively modulate inhibitory avoidance responses in the elevated T-maze. *Behav.Brain Res.* **271**, 249-257.
- SILVEIRA M.C. & GRAEFF F.G. (1992) Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid into the medial hypothalamus of the rat: antagonism by a GABAA receptor agonist. *Behav.Neural Biol.* **57**, 226-232.
- SILVEIRA M.C., ZANGROSSI H., DE B., V, SILVEIRA R. & GRAEFF F.G. (2001) Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behav.Brain Res.* **126**, 13-21.
- SIVANATHAN S., THAVARTNAM K., ARIF S., ELEGINO T. & MCGOWAN P.O. (2015) Chronic high fat feeding increases anxiety-like behaviour and reduces transcript abundance of glucocorticoid signalling genes in the hippocampus of female rats. *Behav.Brain Res.*
- SMITS J.A., ROSENFELD D., MATHER A.A., TART C.D., HENRIKSEN C. & SAREEN J. (2010) Psychotropic medication use mediates the relationship between mood and anxiety disorders and obesity: findings from a nationally representative sample. *J.Psychiatr.Res.* **44**, 1010-1016.
- SOKOLOWSKI K. & CORBIN J.G. (2012) Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. *Front Mol.Neurosci.* **5**, 55
- SOLTIS R.P. & DIMICCO J.A. (1991a) GABAA and excitatory amino acid receptors in dorsomedial hypothalamus and heart rate in rats. *Am.J.Physiol* **260**, R13-R20
- SOLTIS R.P. & DIMICCO J.A. (1991b) Interaction of hypothalamic GABAA and excitatory amino acid receptors controlling heart rate in rats. *Am.J.Physiol* **261**, R427-R433
- STEPHENS D.N. (1980) Does the Lee obesity index measure general obesity? *Physiol Behav.* **25**, 313-315.

- STORLIEN L.H., HUANG X.F., LIN S., XIN X., WANG H.Q. & ELSE P.L. (2001) Dietary fat subtypes and obesity. *World Rev.Nutr.Diet.* **88**, 148-154.
- STOTZ-POTTER E.H., WILLIS L.R. & DIMICCO J.A. (1996) Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. *J.Neurosci.* **16**, 1173-1179.
- SUZUKI K., SIMPSON K.A., MINNION J.S., SHILLITO J.C. & BLOOM S.R. (2010) The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr.J.* **57**, 359-372.
- TERLEVIC R., ISOLA M., RAGOGNA M., MEDURI M., CANALAZ F., PERINI L., RAMBALDELLI G., TRAVAN L., CRIVELLATO E., TOGNIN S., COMO G., ZUIANI C., BAZZOCCHI M., BALESTRIERI M. & BRAMBILLA P. (2013) Decreased hypothalamus volumes in generalized anxiety disorder but not in panic disorder. *J.Affect.Disord.* **146**, 390-394.
- THALER J.P., YI C.X., SCHUR E.A., GUYENET S.J., HWANG B.H., DIETRICH M.O., ZHAO X., SARRUF D.A., IZGUR V., MARAVILLA K.R., NGUYEN H.T., FISCHER J.D., MATSEN M.E., WISSE B.E., MORTON G.J., HORVATH T.L., BASKIN D.G., TSCHOP M.H. & SCHWARTZ M.W. (2012) Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J.Clin.Invest* **122**, 153-162.
- THIBAUT L., WOODS S.C. & WESTERTERP-PLANTENGA M.S. (2004) The utility of animal models of human energy homeostasis. *Br.J.Nutr.* **92 Suppl 1**, S41-S45
- THOMPSON R.H. & SWANSON L.W. (1998) Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Res.Brain Res.Rev.* **27**, 89-118.
- TREIT D., MENARD J. & ROYAN C. (1993) Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **44**, 463-469.
- TRYON M.S., DECANT R. & LAUGERO K.D. (2013) Having your cake and eating it too: a habit of comfort food may link chronic social stress exposure and acute stress-induced cortisol hyporesponsiveness. *Physiol Behav.* **114-115**, 32-37.
- VELLOSO L.A. (2009) The brain is the conductor: diet-induced inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism. *Arq Bras.Endocrinol.Metabol.* **53**, 151-158.
- WALLS A.B., WAAGEPETERSEN H.S., BAK L.K., SCHOUSBOE A. & SONNEWALD U. (2015) The Glutamine-Glutamate/GABA Cycle: Function, Regional Differences in Glutamate and GABA Production and Effects of Interference with GABA Metabolism. *Neurochem.Res.* **40**, 402-409.
- WANDERLEY E.N. & FERREIRA V.A. (2010) [Obesity: a plural perspective]. *Cien.Saude Colet.* **15**, 185-194.
- WANG H., STORLIEN L.H. & HUANG X.F. (2002) Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **282**, E1352-E1359
- WARNEKE W., KLAUS S., FINK H., LANGLEY-EVANS S.C. & VOIGT J.P. (2014) The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague-Dawley rats of different ages. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **116**, 45-54.

- WHOOLEY O. (2010) Diagnostic ambivalence: psychiatric workarounds and the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. *Sociol.Health Illn.* **32**, 452-469.
- WOODS S.C., SEELEY R.J., RUSHING P.A., D'ALESSIO D. & TSO P. (2003) A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J.Nutr.* **133**, 1081-1087.
- WOUD M.L., ZHANG X.C., BECKER E.S., MCNALLY R.J. & MARGRAF J. (2014) Don't panic: interpretation bias is predictive of new onsets of panic disorder. *J.Anxiety.Disord.* **28**, 83-87.
- ZANGROSSI H., Jr. & GRAEFF F.G. (1997) Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res.Bull.* **44**, 1-5.
- ZANGROSSI H., Jr. & GRAEFF F.G. (2014) Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **46 Pt 3**, 397-406.
- ZARETSKAIA M.V., ZARETSKY D.V., SARKAR S., SHEKHAR A. & DIMICCO J.A. (2008) Induction of Fos-immunoreactivity in the rat brain following disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res.* **1200**, 39-50.
- ZHAO J. & LAWLESS M.W. (2013) Stop feeding cancer: pro-inflammatory role of visceral adiposity in liver cancer. *Cytokine* **64**, 626-637.