

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

RAFAELA PINTO COELHO SANTOS

**EFEITOS DA OBESIDADE EM CAMUNDONGOS SOBRE A EXPRESSÃO E
EXTINÇÃO DE RESPOSTAS AVERSIVAS NO TESTE DE MEDO CONDICIONADO
AO CONTEXTO**

Belo Horizonte

2019

Rafaela Pinto Coelho Santos

**EFEITOS DA OBESIDADE EM CAMUNDONGOS SOBRE A EXPRESSÃO E
EXTINÇÃO DE RESPOSTAS AVERSIVAS NO TESTE DE MEDO CONDICIONADO
AO CONTEXTO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar

Coorientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira

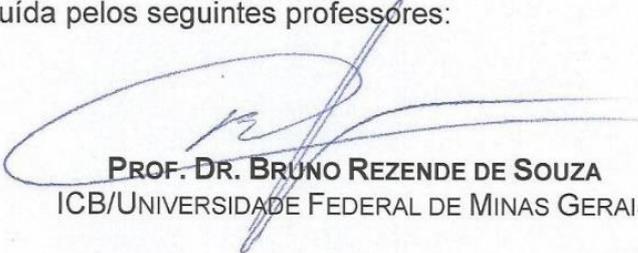
Belo Horizonte

2019

"EFEITOS DA OBESIDADE EM CAMUNDONGOS SOBRE A EXPRESSÃO E EXTINÇÃO DE RESPOSTAS AVERSIVAS NO TESTE DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO"

RAFAELA PINTO COELHO SANTOS

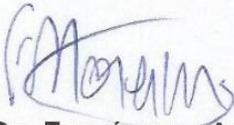
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 07 de junho de 2019, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



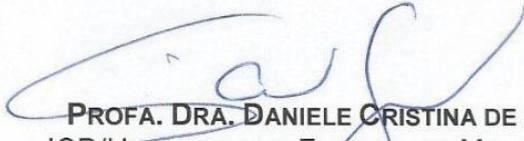
PROF. DR. BRUNO REZENDE DE SOUZA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRA. LUCIENE BRUNO VIEIRA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. FABRÍCIO DE ARAUJO MOREIRA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COORIENTADOR



PROFA. DRA. DANIELE CRISTINA DE AGUIAR
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 07 de junho de 2019

Agradecimentos

Meus agradecimentos iniciais vão primeiramente à Deus e sua clemência ilimitada que foram meu alicerce e permitiram a realização de mais este sonho.

À minha orientadora Profa. Dra. Daniele C. de Aguiar que foi uma grande mestra, com sabedoria e paciência me apoiou, ensinou e caminhou comigo durante todo tempo. Meu sincero muito obrigada!!!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Fabrício A. Moreira por todos ensinamentos. A todos amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, em especial à Nícia, João e Júlia pelo carinho e ajuda.

Aos técnicos Rinaldo e Webster que cuidaram com muito carinho dos nossos animais.

Ao Jamil pelas doações de gelo seco. E aos animais que doaram sua vida à Ciência.

Às agências de fomento CNPq e CAPES.

E não posso deixar de fazer os agradecimentos pessoais...

Ao meu pai Nerilton e minha mãe Dorotéa que com todo amor, carinho, união e paciência me ajudam a caminhar e, especialmente durante o mestrado, me seguraram firme quando o fardo se tornava pesado.

A minha irmã Carol e cunhado Bira que me aconselharam e apoiaram muito. Ao meu sobrinho João Gabriel que alegra os meus dias.

Aos meus familiares, em especial às grandes Mulheres: Du, Gá, Mara, Títia Mariinha, Camilinha, Bruna, Mayara e Thata que são essenciais à minha vida e carinhosamente me ajudaram muito no mestrado. Aos meus primos Rubinho, Gabriel e Gui, aos amigos Nativo, Dian e Thiago que especialmente nesta fase da minha vida me ajudaram e incentivaram muito.

À minha avó Nerilda e avô Juarez que sempre torceram por mim.

Por fim, mas não menos importante, aos meus amigos da vida, do ELETROCEL e da UFMG, meu sincero muito obrigada!!!

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe Dorotéa, ao meu pai Nerilton, irmã Carol, cunhado Bira, sobrinho João Gabriel, Vovó Nerilda, Vovô Juarez, às Mulheres da família e à minha Professora Daniele Aguiar.

*“Entre ‘ser ou não ser’
Um breve suspiro...
Nem sempre respostas exatas
Nem sempre o que se espera*

*Um olhar atento
Uma voz esperançosa
Como uma mãe que dá a mão
e ajuda o filho a caminhar*

*Entre um ‘ser ou não ser’
Passos firmes e esperançosos
Entre ‘ser ou não ser’
A caminhada é dura,
O caminho é longo*

*Entre ‘ser ou não ser’
Não sei!
Dou um breve suspiro...
E esperançosamente sigo”*

(Rafaela Pinto Coelho Santos, 2019)

Resumo

A obesidade é um problema de saúde pública e está associada ao surgimento de diversas comorbidades, incluindo os transtornos de ansiedade. A obesidade é resultante da expansão exacerbada do tecido adiposo, a qual altera a homeostasia do organismo e induz uma resposta inflamatória sistêmica crônica e de baixo grau. O aumento de citocinas pró-inflamatórias periféricas promove a ativação do sistema imune e, possivelmente, neuroinflamação no sistema nervoso central (SNC). Conseqüentemente, há a liberação de óxido nítrico (NO), em decorrência da indução da enzima óxido nítrico sintase (iNOS). O excesso de NO no SNC também está associado ao surgimento de transtornos de ansiedade e de estresse pós-traumático (TEPT). O objetivo deste estudo foi investigar a influência da obesidade sobre a expressão e extinção da memória aversiva, utilizando o teste do medo condicionado ao contexto (MCC), além de subseqüentemente verificar a participação do NO, via iNOS. Em nossos estudos, foram utilizados animais machos em dois modelos de obesidade: um modelo genético de camundongos que apresentam mutação para o receptor da leptina (*db/db*), e um modelo de obesidade induzido por dieta de cafeteria (DCaf) durante 4 semanas. Todos os animais foram submetidos ao teste do MCC, o qual um estímulo aversivo (três choques randomizados, com intensidade de 0,3mA e duração de 2s) foi pareado a um estímulo neutro (caixa de condicionamento). Após 24 horas (Dia 1 – Teste), os animais foram reexpostos à caixa por 5 minutos e tiveram o tempo de imobilidade determinados. Para avaliação da extinção da memória aversiva, os animais foram reapresentados à caixa durante três dias com intervalo de 48 horas (Dias 3, 5 e 7). Para investigar a participação da iNOS sobre as alterações comportamentais promovidas, administrou-se via *i.p* um inibidor da iNOS 30 minutos antes do Teste. Os resultados indicam que a dieta de cafeteria induziu obesidade nos animais. Contudo, no teste do MCC observamos dois perfis de resposta: no primeiro dia de experimento, os animais DCaf apresentaram aumento na expressão da resposta de medo quando comparados aos controles. No entanto, essa diferença não foi observada no experimento subseqüente. O pré-tratamento com inibidor da iNOS aminoguanidina (50mg/kg) também não modificou a imobilidade dos animais. Considerando então a diferença nos resultados com os animais DCaf, postulamos que outras possíveis variáveis como: genótipo, remodelamento do tecido adiposo, microbiota e clima poderiam estar associados a essa discrepância nos dados obtidos. Os animais *db/db* exibiram comportamento tipo-ansiosgênico e prejuízo na extinção da memória aversiva. Além disto, o pré-tratamento agudo com inibidores de iNOS (aminoguanidina 50mg/kg e 1400W 0,5 µg/kg) não alterou esta resposta.

Palavras-chave: obesidade, dieta de cafeteria, leptina, óxido nítrico, medo condicionado ao contexto

Abstract

The obesity is a public health problem associated with the development of several comorbidities, including anxiety and depression. Obesity is also a result of the exacerbated expansion of adipose tissue, which modifies the homeostasis of the organism inducing a chronic and low-grade systemic inflammatory response. The increase of peripheral pro-inflammatory cytokines promotes the activation of the immune system and possibly, neuroinflammation in the central nervous system (CNS). Consequently, there is an increase of Nitric Oxide (NO) mainly released from the activation of inducible nitric oxide synthase (iNOS). The excess of NO in the CNS is also associated with anxiety disorders and post-traumatic stress disorder (PTSD). The goal of this study was to investigate the influence of obesity in the expression and extinction of aversive memory in fear conditioning context test (FCCT), and subsequent role of NO, via iNOS. Two models of obesity were employed: a genetic mouse model with leptin receptor mutation (*db/db*), and also an obesity model induced by consumption of cafeteria diet (DCaf) for 4 weeks. All animals were submitted to FCCT. where an aversive stimulus (three randomized shocks, with intensity of 0.3mA and duration of 2s) was paired with a neutral stimulus (conditioning box). After 24 hours (Day 1 – Test), animals were re-exposed to the box for 5 minutes and the time of immobility was determined. To evaluate the extinction of the aversive memory, the animals were re-exposed to the conditioning box for three days with a 48-hour interval (Days 3, 5 and 7). In order to investigate the role of iNOS on the behavioral changes, an iNOS inhibitor was administered via i.p. 30 minutes prior to the FCCT. The results suggest that the cafeteria diet induced obesity in the animals. However, we also observed two different profiles on behavior response in the FCCT: In the first experiment, DCaf fed animals displayed an increase in the immobility time as compared to the control group. Although the same effect was not observed in the subsequent experiment. The pre-treatment with iNOS inhibitor aminoguanidine (50 mg/kg) did not alter the freezing behavior of the animals. Thus, it would be possible to suggest that other factors such as: genotype, remodeling of adipose tissue, microbiota and climate, might be associated to the data obtained. The *db/db* mice exhibited anxiogenic-like behavior and impairment in the extinction of aversive memory. Moreover, the acute pre-treatment with iNOS inhibitors (aminoguanidine 50 mg/kg and 1400W 0.5 µg/kg) did not change this response.

Key words: obesity, cafeteria diet, leptin, nitric oxide, 1400W, contextual fear conditioning

Sumário

1	Introdução	14
1.1	Obesidade e dados epidemiológicos	14
1.2	Obesidade e inflamação	15
1.3	Modelo genético de obesidade	17
1.4	Modelos de obesidade induzidos por dietas experimentais	19
1.5	Ansiedade, medo e memória aversiva	20
1.6	Óxido nítrico	23
2	Objetivo geral	25
2.1	Objetivos específicos	25
3	Materiais e Métodos	26
3.1	Animais experimentais	26
3.2	Dieta Experimental	26
3.3	Drogas	28
3.4	Teste de Medo Condicionado ao Contexto (MCC)	28
3.5	Delineamento experimental	29
3.5.1	Efeito da obesidade induzida pela dieta de cafeteria sobre a expressão e extinção da memória aversiva no Teste do MCC e a participação da iNOS sobre estes comportamentos	29
3.5.2	Efeito da obesidade em animais <i>db/db</i> sobre a expressão e extinção da memória aversiva no Teste do MCC e a participação da iNOS sobre estes comportamentos	30
3.6	Índice de adiposidade	30
3.7	Análise estatística	30
4	Resultados	31
4.1	Análise do peso corporal, tecido adiposo e índice de adiposidade dos animais submetidos à dieta CT ou DCaf	31
4.1.1	Peso corporal e índice de adiposidade	31
4.2	Análise do peso corporal dos animais <i>WT^(+/?)</i> e <i>db/db</i>	33
4.3	Teste comportamental	34
4.3.1	Análise comportamental no teste do MCC dos animais submetidos à dieta CT ou DCaf tratados ou não com AMG 50 mg/kg	34

4.3.2 Análise comportamental no teste do MCC dos animais WT ^(+/?) e <i>db/db</i> tratados ou não com inibidores da iNOS	35
5 Discussão.....	38
6 Conclusão	46
Referências bibliográficas	47
Apêndice	60

Lista de figuras

Figura 1 - Neuroinflamação induzida por inflamação periférica desencadeada na obesidade.....	17
Figura 2 - Esquema representativo das fases da memória aversiva no Teste de Medo Condicionado ao Contexto	22
Figura 3 - Esquema representativo do protocolo adotado no teste comportamental de medo condicionado ao contexto.....	29
Figura 4 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais submetidos à dieta CT ou DCaf nos dias 1, 3, 5 e 7	34
Figura 5 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais da dieta CT ou DCaf que receberam salina ou AMG 50 mg/kg	35
Figura 6 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais WT ^(+/?) ou <i>db/db</i> nos dias 1, 3, 5 e 7	36
Figura 7 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais WT ^(+/?) ou <i>db/db</i> tratados com salina ou AMG 50 mg/kg	37
Figura 8 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais WT ^(+/?) ou <i>db/db</i> tratados com salina ou 1400W 0,5 µg/kg	37
Figura A1 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais Balb-C controle ou dieta HC	61
Figura A2 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais Balb-C controle ou dieta HC tratados com salina ou AMG 50 mg/kg	62
Figura A3 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais Balb-C controle ou dieta HC	63
Figura A4 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais Balb-C controle ou dieta HC tratados com salina ou AMG 50 mg/kg	64
Figura A5 – Peso médio dos animais da dieta controle e dieta HC após 13 semanas de tratamento	65
Figura A6 – Índice de adiposidade dos animais da dieta controle e dieta HC após 13 semanas de tratamento	65
Figura A7 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC em animais C57 selvagem WT ^(+/?) tratados com salina ou 1400W 0,75 µg/kg	66

Lista de tabelas

Tabela 1 – Tecido adiposo, peso corporal e IA dos animais submetidos à dieta CT ou DCaf tratados ou não com salina ou AMG 50 mg/kg..... **32**

Tabela 2 – Peso médio dos animais WT^(+/?) e *db/db* tratados ou não com inibidores da iNOS..... **33**

Lista de quadros

Quadro 1 - Ingredientes da dieta doce **27**

Quadro 2 - Ingredientes da dieta salgada **27**

Lista de abreviaturas e símbolos

1400W - N-(3-(Aminometil)benzil)acetamidina

+/+ - Animal Homozigoto Dominante

AMG - Aminoguanidina

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CEBIO UFMG - Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais

CT - Dieta Controle

db - Gene Responsável pela Codificação da Isoforma b do Receptor para Leptina

db/db - Animal Espontaneamente Mutante para a Isoforma b do Receptor de Leptina

db/+ - Animal Selvagem Heterozigoto

DCaf - Dieta de Cafeteria

DM2 - Diabetes Mellitus Tipo II

eNOS - Óxido Nítrico Sintase Endotelial

FAA - Ácidos Graxos Livres

HC - Dieta Rica em Carboidrato

HF - Dieta Rica em Gordura

i.p. - Injeção Intraperitoneal

IA - Índice de Adiposidade

IL-10 - Interleucina 10

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

IMC - Índice de Massa Corporal

iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzível

JAK - Quinase da Família Janus

Ki - Constante de Inibição

LCE - Labirinto em Cruz Elevado

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade

LPS - Lipopolissacarídeo

M1 - Macrófagos de Ação Pró-inflamatória do Tipo M1

M2 - Macrófagos de Ação Anti-inflamatória do Tipo M2

MCC - Medo Condicionado ao Contexto

MC - Medo Condicionado
NF-kB - Fator Nuclear kappa B
NMDA - N-metil D-aspartato
nNOS - Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO - Óxido Nítrico
NOS - Óxido Nítrico Sintase
Ob - Gene Responsável pela Codificação da Leptina
ob/ob - Animais Espontaneamente Mutante para a Produção de Leptina
Ob-R - Receptor para Leptina
OMS - Organização Mundial de Saúde
SM - Síndrome Metabólica
SNC - Sistema Nervoso Central
TA - Tecido Adiposo
TAE - Tecido Adiposo Epididimal
TAM - Tecido Adiposo Mesentérico
TAR – Tecido Adiposo Retroperitoneal
TEPT - Transtorno de Estresse Pós-traumático
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α
Vigitel - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
WT - Animal Selvagem
WT^(+/?) - Animal Selvagem sem Distinção entre Homozigoto e Heterozigoto

1 Introdução

1.1 Obesidade e dados epidemiológicos

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como excesso ou acúmulo anormal de tecido adiposo que representa risco à saúde. Atualmente é considerada uma pandemia atingindo cerca de 13% da população mundial (OMS, 2016). Segundo dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico no Brasil (Vigitel), mais da metade da população brasileira está com sobrepeso, 57,7% dos homens e 50,5% das mulheres, sendo 18,9% dos indivíduos obesos (Vigitel, 2016).

O excesso de peso é estabelecido através do cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), o qual é determinado através da relação entre o peso do indivíduo (kg) dividido pelo quadrado da altura (metros²). Indivíduos com valores de IMC < 25 são considerados com IMC normal, entre ≥ 25 e <30 com sobrepeso, enquanto os que apresentam valores de IMC ≥ 30 são considerados obesos (OMS, 2000).

O IMC é o parâmetro utilizado pela OMS para classificar a obesidade (OMS, 2000) e representa bem os dados estatísticos em uma população. No entanto, para a análise individual pode não ser o mais indicado, uma vez que o mesmo IMC pode refletir composição corporal diferente e, conseqüentemente, o quadro clínico e as comorbidades associadas serão distintas. A porcentagem de gordura elevada e IMC normal é conhecido como obesidade de peso normal, fator que representa risco à saúde dos indivíduos [ABESO, 2008; (Ruderman *et al.*, 1998; Romero-Corral *et al.*, 2010; Oliveros *et al.*, 2014)]. Assim, o IMC não deve ser o único método para indicar o acúmulo excessivo de tecido adiposo, podendo ser associado a outras formas de avaliação, como por exemplo, a medida de pregas cutâneas ou ainda o teste de Bioimpedância, o qual avalia a porcentagem da composição corporal, relação entre massa magra, gordura e água corporal (Lemos e Gallagher, 2017).

A obesidade e 'obesidade do peso normal' são importantes condições que podem resultar na síndrome metabólica [SM (OMS; ABESO)], estado patológico onde o indivíduo apresenta no mínimo três condições a seguir: obesidade abdominal, dislipidemia, aumento da pressão arterial, resistência à insulina, hiperglicemia e estado pró-inflamatório (Grundy *et al.*, 2004). Com isto, a obesidade, mais especificamente a SM, favorece o desenvolvimento de: diabetes tipo 2, hipertensão,

acidente vascular encefálico, alguns tipos de cânceres (Bhupathiraju e Hu, 2016; Bhupathiraju *et al.*, 2016; Ortega *et al.*, 2016) e distúrbios no sistema nervoso central (SNC), como Alzheimer, depressão e ansiedade (Garipey, Nitka, *et al.*, 2010; Garipey, Wang, *et al.*, 2010; Lopresti e Drummond, 2013; Wiltink *et al.*, 2013). As alterações fisiopatológicas, decorrentes da obesidade, também podem ser desencadeadas em animais, seja através de modelos genéticos de obesidade ou dietas experimentais obesogênicas. Com isso, esses modelos são amplamente utilizados para mimetizar a obesidade e síndrome metabólica nos seres humanos e, úteis para entender a fisiopatologia da obesidade, bem como as comorbidades associadas.

1.2 Obesidade e inflamação

O tecido adiposo (TA) é classificado como uma variação do tecido conjuntivo (tecido conjuntivo adiposo), onde os principais constituintes são os adipócitos e fração vascular estromal composta por células de defesa, células tronco, endoteliais e eritrócitos. A função mais conhecida do TA é estoque de gordura/energia, porém este órgão também apresenta importante papel na regulação hormonal, inflamação, balanço energético e isolamento térmico [para revisão (Mohamed-Ali *et al.*, 1998; Trayhurn e Beattie, 2007; Luo e Liu, 2016)].

Para manutenção do controle energético e homeostasia, o TA regula a liberação de hormônios e citocinas, que são mediadores inflamatórios. A inflamação tem papel fisiológico fundamental no remodelamento do TA. Entretanto, a expansão exacerbada do TA leva a morte de adipócitos, hipóxia, estresse mecânico devido à expansão do adipócito e também há resposta pró-inflamatória, em decorrência do aumento da expressão de genes associados à inflamação, aumentando a liberação de fatores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), hormônio leptina e formação de ácidos graxos livres (FFA), o que induz o recrutamento de macrófagos no TA do tipo M1, que expressa função pró-inflamatória; e reduz fatores anti-inflamatórios no TA como interleucina 10 (IL-10) e macrófagos do tipo M2, que exibe função anti-inflamatória (Saltiel e Olefsky, 2017).

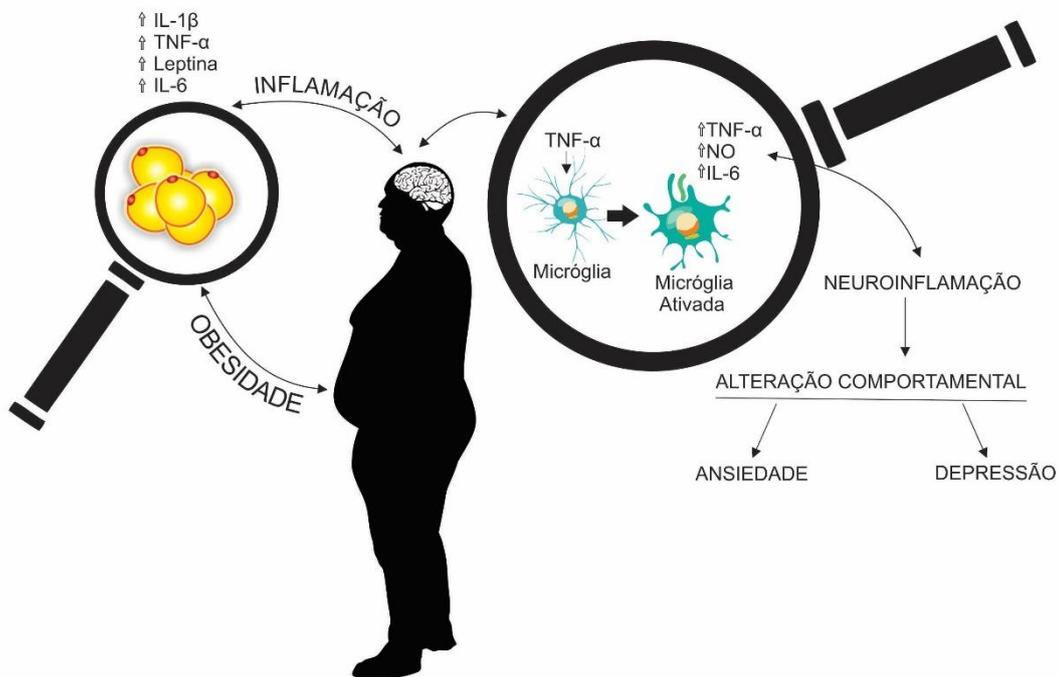
Em diversos modelos de inflamação periférica, como indução de inflamação pela administração sistêmica do lipopolissacarídeo (LPS) de membrana de bactérias Gram-negativas e/ou na obesidade, é observado também aumento de citocinas pró-

inflamatórias no sistema nervoso central [SNC (Dantzer, 2018)]. O TNF α é a principal citocina descrita na fisiopatologia da obesidade e inflamação (Galic *et al.*, 2010), induz a resistência à insulina e à leptina (Galic *et al.*, 2010; Cao, 2014; Kim *et al.*, 2014; Reilly e Saltiel, 2017), promove a ativação de células de defesa, como macrófagos na periferia (Saltiel e Olefsky, 2017), e atravessa a barreira hematoencefálica (BBB), que separa e protege o SNC do sistema periférico, atinge o encéfalo e provoca neuroinflamação. Esta, por sua vez, promove a transcrição gênica (Maldonado-Ruiz *et al.*, 2017) e a liberação de mediadores pró-inflamatórios como o óxido nítrico [NO (Rao, 2000)].

No SNC as principais células de defesa responsáveis pela manutenção da inflamação são os macrófagos residentes do SNC, denominados micróglia. Eles exibem importante papel na neurogênese e plasticidade sináptica (Maldonado-Ruiz *et al.*, 2017). Entretanto, a neuroinflamação compromete a homeostasia do encéfalo e induz alterações cognitivas como prejuízo da memória. Além disso, está associada ao desenvolvimento de diversas neuropatologias como Alzheimer e Demência, transtorno bipolar, depressão, ansiedade e estresse pós-traumático [TEPT (Aguilar-Valles *et al.*, 2015; Rummel, 2016; Dantzer, 2018)].

Em resumo, como exemplificado na Figura 1, a expansão do tecido adiposo induz a liberação de fatores pró-inflamatórios que atingem o SNC, provocando a ativação microglial que, por sua vez, aumenta a liberação de mediadores pró-inflamatórios no cérebro e favorece o comportamento de ansiedade e depressão.

Figura 1 - Neuroinflamação induzida por inflamação periférica desencadeada na obesidade



1.3 Modelo genético de obesidade

Existem muitas alterações genéticas associadas ao desenvolvimento de obesidade, como mutações em genes responsáveis pela codificação de hormônios e/ou seus receptores (Coleman, 1978; Farooqi e O'rahilly, 2014). Dentre eles, tem-se a leptina, uma proteína circulante de 16kDa codificada pelo gene *Ob* e secretada pelos adipócitos, associada ao controle do balanço energético (Zhang *et al.*, 1994). Sua principal ação é no encéfalo, onde atua em seus receptores (OB-R), os quais estão associados à via de transdução de proteínas quinases, especificamente as quinases da família Janus [JAK, (Tartaglia, 1997)]. A ligação da leptina ao receptor desencadeia a dimerização do receptor acoplado às JAKs e transdução de sinal via STAT3 (Myers *et al.*, 2008). A principal função da leptina é no hipotálamo, onde estimula a saciedade, ou seja, apresenta ação anorexígena (Zhang *et al.*, 1994). Adicionalmente, apresenta papel importante sobre diversas funções biológicas como reprodução, metabolismo, memória e cognição (Wasim *et al.*, 2016).

Alterações na via da leptina, seja em sua produção ou em sua sinalização, favorecem o desenvolvimento da obesidade tanto em humanos quanto em

animais (Farooqi e O'rahilly, 2014). Foi observado na linhagem de camundongos C57BL/KsJ que alguns animais exibiram fenótipo obeso após apresentarem espontaneamente uma mutação no gene *db*, presente no cromossomo 4. Estes animais foram denominados camundongos *db/db* (Coleman, 1978). Mais tarde foi identificado que este gene é responsável pela codificação da isoforma b do receptor para leptina (Tartaglia *et al.*, 1995). Portanto, nestes animais há prejuízo na sinalização da leptina, conseqüentemente, foi observado hiperfagia, aumento de peso e gordura corporal, e redução de massa magra em decorrência da ingestão calórica exacerbada (Sharma *et al.*, 2010; Ernst *et al.*, 2013; Dey *et al.*, 2014). Adicionalmente, foram relatadas alterações metabólicas, polidipsia, dislipidemia, hiperglicemia e hiperinsulinemia (Makar *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 2010; Ernst *et al.*, 2013; Dey *et al.*, 2014; Sasaki *et al.*, 2015). Além disto, foi descrito que estes animais apresentaram aumento da inflamação periférica e do SNC, com o aumento de fatores pró-inflamatórios, IL-1 β e TNF- α (Dey *et al.*, 2014), redução de fatores anti-inflamatórios - IL-10 e fator neurotrófico derivado do cérebro [BDNF (Ernst *et al.*, 2013; Wosiski-Kuhn *et al.*, 2014)]- e alteração na morfologia do cérebro, o que pode acarretar no prejuízo de diversas funções, como por exemplo, memória (Makar *et al.*, 1995; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2014; Wosiski-Kuhn *et al.*, 2014).

Além dessas alterações, os animais *db/db* podem exibir alterações comportamentais como por exemplo, comportamento tipo depressivo (Sharma *et al.*, 2010; Wosiski-Kuhn *et al.*, 2014) e tipo ansiogênico (Zhao *et al.*, 2012). Adicionalmente, dados da literatura apontaram que esses animais apresentaram prejuízo na memória espacial (Sharma *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012; Wosiski-Kuhn *et al.*, 2014; Kalani *et al.*, 2017) e na memória de reconhecimento de um novo objeto (Zhao *et al.*, 2012). Por outro lado, vale ressaltar que Sharma *et al.* (2010) e Wosiski-Kuhn *et al.* (2014) observaram comportamento tipo ansiolítico nessa linhagem. Em resumo, estes estudos sugerem que a obesidade induzida pela deficiência no receptor para leptina em animais *db/db* alteram a fisiologia e podem favorecer os comportamentos associados à ansiedade e depressão, além de promover prejuízos na memória.

1.4 Modelos de obesidade induzidos por dietas experimentais

Quando há desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto de energia, o excesso consumido é depositado em forma de gordura nos adipócitos. Portanto, além de alterações genéticas, fatores ambientais como maus hábitos alimentares e falta de atividade física, levam à obesidade. Estes fatores podem induzir a expansão do tecido adiposo de diversas maneiras, seja pelo consumo excessivo de calorias, pelo desbalanço na proporção de gordura-carboidrato-proteína ou pela qualidade da alimentação, como ingestão de produtos industrializados e uso de agrotóxicos (Chaput *et al.*, 2012; Darbre, 2017; Mostafalou e Abdollahi, 2017). Logo, a má alimentação leva à obesidade e suas consequências metabólicas, como: síndrome metabólica, diabetes, problemas circulatórios, inflamatórios e alguns tipos de cânceres, que podem ser mimetizadas por dietas experimentais (Clegg *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013; Zeeni *et al.*, 2015; Bourlier *et al.*, 2017; Hall, 2017). Deste modo, animais com obesidade induzida por dieta apresentam a vantagem de mimetizar a doença de seres humanos.

De uma maneira geral, as dietas obesogênicas induzem a expansão da adiposidade com ou sem aumento do peso corporal (Oliveira *et al.*, 2013; Gac *et al.*, 2015; Woodie e Blythe, 2018; Teixeira *et al.*, 2019) e, conseqüentemente, promovem alterações compatíveis com a síndrome metabólica como: aumento de colesterol, LDL (lipoproteína de baixa densidade), triglicerídeos, glicemia, insulinemia, resistência à insulina e citocinas pró-inflamatórias (Sampey *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015; Zeeni *et al.*, 2015; Lacerda *et al.*, 2018).

As principais dietas são: rica em carboidratos (HC), rica em lipídeos (HF) e rica em carboidratos e lipídeos, também conhecida como dieta de cafeteria (DCaf).

A dieta rica em carboidratos (HC) é elaborada a partir da frutose (Wu *et al.*, 2015; Woodie e Blythe, 2018) e/ou sacarose (Oliveira *et al.*, 2013). Em animais tratados com esta dieta foi observado aumento do comportamento tipo compulsivo (Gomes *et al.*, 2018), depressivo, maior susceptibilidade ao estresse (Santos *et al.*, 2018) e prejuízo na memória espacial (Wu *et al.*, 2015; Woodie e Blythe, 2018). Em animais tratados com dieta rica em lipídeos (HF) foi observado prejuízo na memória (Sobesky *et al.*, 2014) e aumento do comportamento tipo ansiogênico e anedonia associados com aumento de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo (Dutheil *et al.*, 2016), região neural associada aos transtornos de ansiedade e depressão (Phillips e

Ledoux, 1992; Charney, 2003).

Outro modelo de dieta amplamente utilizado é a dieta de cafeteria (DCaf), a qual apresenta grande semelhança com os hábitos alimentares atuais dos seres humanos, pois é elaborada a partir de alimentos industrializados como: biscoitos, chocolates, chips de batata, sucos ou refrigerantes (Sampey *et al.*, 2011; Carillon *et al.*, 2013; Zeeni *et al.*, 2015). Alguns grupos de pesquisa observaram alterações comportamentais em roedores obesos induzidos pela DCaf, como comportamento tipo ansiogênico (Baker e Reichelt, 2016), hiperfagia (Shafat *et al.*, 2009), anedonia (Gac *et al.*, 2015) e prejuízo na memória (Reichelt *et al.*, 2015). Adicionalmente, em ratas obesas e estressadas, também foi observado comportamento tipo ansiogênico e tipo depressivo (Da Costa Estrela *et al.*, 2015). No teste comportamental de medo condicionado (MC) Baker e Reichelt (2016) observaram resposta tipo ansiogênica e prejuízo na extinção da memória aversiva. Entretanto, Reichelt *et al.* (2014) observaram redução da expressão da memória aversiva no teste de MC. Leffa *et al.* (2015) também observaram efeito ansiolítico e antidepressivo da dieta de cafeteria e não observaram alteração na memória no teste de reconhecimento de um novo objeto (Leffa *et al.*, 2015). Aparentemente, a discrepância dos dados referentes à DCaf está associada a diferentes condições experimentais, como por exemplo a idade dos animais no início do tratamento, protocolo da dieta e tempo que o animal é submetido à dieta.

1.5 Ansiedade, medo e memória aversiva

É bem descrito na literatura que indivíduos com algum distúrbio psiquiátrico, por exemplo transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), apresentam grande probabilidade de desenvolver obesidade em alguma fase da vida (Lopresti e Drummond, 2013). Estudos recentes mostram que há uma relação bidirecional entre a obesidade e esses distúrbios, relatando maior prevalência de doenças neurodegenerativas e transtornos psiquiátricos como: depressão, transtorno bipolar e ansiedade em consequência do sobrepeso (Garipey, Wang, *et al.*, 2010; Lopresti e Drummond, 2013; Wiltink *et al.*, 2013).

Comportamentos associados ao medo e ansiedade assemelham-se às respostas que os animais apresentam durante situações de perigo e possuem as bases neurofisiológicas preservadas ao longo da Evolução (Ledoux, 2000; Milad e

Quirk, 2012; Parsons e Ressler, 2013; Krause, 2015; Izquierdo *et al.*, 2016). Neste sentido, é importante o estudo de comportamentos de ansiedade, depressão, memória e medo em modelos animais de obesidade, que permite um entendimento translacional desses processos em humanos (Milad *et al.*, 2006).

A ansiedade e o medo são respostas naturais de caráter defensivo ((Fendt e Fanselow, 1999). Entretanto, a exacerbação dessas respostas pode levar a quadros patológicos tais como TEPT (Ledoux, 2000; Parsons e Ressler, 2013). Esta doença se desenvolve após a experiência de um evento traumatizante como vivência de desastre ambiental, guerra, violência física ou sexual, entre outros (Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5.^a edição, DSM-V). Neste transtorno ocorre a exacerbação do estado de ansiedade e há prejuízo da extinção da memória traumática (Milad *et al.*, 2006; Milad e Quirk, 2012; Izquierdo *et al.*, 2016). É uma doença debilitante para o indivíduo, acarretando em prejuízo social, profissional e interpessoal (DSM-V).

Frente a uma ameaça, por exemplo um predador, o circuito de medo é acionado e desencadeia respostas defensivas (Ledoux, 1992; Fendt e Fanselow, 1999). Desta forma, os processos da memória de medo acontecem de forma ativa com síntese proteica e plasticidade sináptica (Milad e Quirk, 2012; Parsons e Ressler, 2013). Estas respostas defensivas são estudadas em diversos modelos de testes comportamentais, por exemplo, através do teste de medo condicionado ao som e medo condicionado ao contexto (Ledoux, 1992; Milad e Quirk, 2012; Maren *et al.*, 2013). Cada teste experimental está relacionado a um estímulo que desencadeia a resposta de medo e ativa circuitos cerebrais específicos (Ledoux, 1992; 2000; Myers e Davis, 2006; Maren *et al.*, 2013).

No teste de medo condicionado ao contexto, as principais regiões encefálicas responsáveis pela resposta do medo contextual são hipocampo, amígdala e tronco encefálico, gerando respostas comportamentais, respostas analgésicas, reflexas, endócrinas e autonômicas, como alteração da pressão arterial e da frequência cardiorrespiratória [(Fendt e Fanselow, 1999; Ledoux, 2000)ver mais em(Ledoux, 2000)].

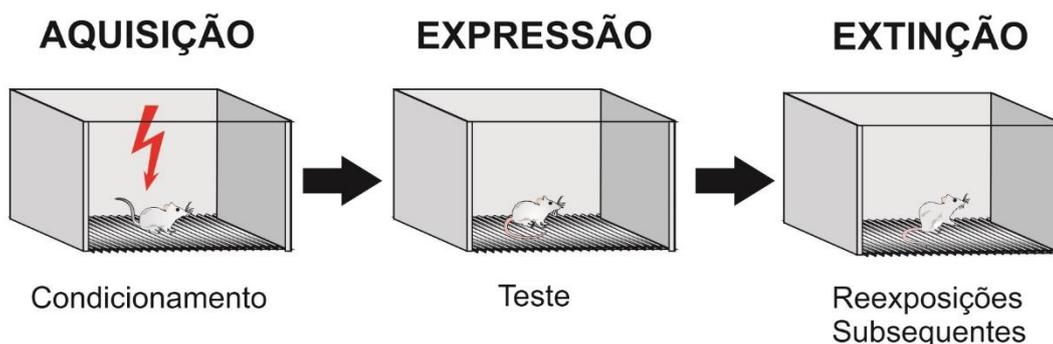
Nos modelos de medo condicionado é possível investigar os processos de aquisição, consolidação, expressão e extinção da memória aversiva (Myers e Davis, 2006; Maren *et al.*, 2013). No teste de medo condicionado ao contexto (MCC) um estímulo aversivo (incondicionado), como por exemplo o choque nas patas, é

associado a um estímulo neutro (condicionado), no caso o ambiente no qual o animal recebeu o choque. Durante a reapresentação ao estímulo neutro (ambiente) o animal apresenta um comportamento de medo/ansiedade, mesmo sem receber o estímulo aversivo. Há também alterações fisiológicas como aumento de pressão arterial, frequência cardíaca e redução da temperatura da cauda [ver mais (Fendt e Fanselow, 1999; Ledoux, 2000)].

Neste modelo a **aquisição** da memória aversiva ocorre durante o período da exposição do animal ao ambiente juntamente ao estímulo aversivo - o choque (Fendt e Fanselow, 1999). Subsequentemente, há o processo de **consolidação** da memória aversiva que pode durar de horas a dias após a aquisição (Fendt e Fanselow, 1999). A primeira reexposição à caixa (sem o choque) é o período onde avalia-se a **expressão** da memória de medo. Reexposições subsequentes ao ambiente sem o estímulo aversivo levam ao processo de **extinção** da memória aversiva [(Ledoux, 2000; Ahi, 2004; Milad *et al.*, 2006; Parsons e Ressler, 2013; Milad e Radulovic, 2014; Krause, 2015; Izquierdo *et al.*, 2016) Figura 2].

Nos testes de medo condicionado um parâmetro muito importante utilizado para avaliar o comportamento de ansiedade/medo é o comportamento de 'congelamento', o qual o animal apresenta-se completamente imóvel, exibindo apenas movimentos autonômicos como respiração (Fendt e Fanselow, 1999; Ledoux, 2000; Ahi, 2004; Milad *et al.*, 2006; Parsons e Ressler, 2013; Milad e Radulovic, 2014; Krause, 2015; Izquierdo *et al.*, 2016). Em um ambiente natural, tal comportamento possibilita que o animal não seja percebido facilmente pelo predador e favoreça a sobrevivência (Fendt e Fanselow, 1999).

Figura 2 - Esquema representativo das fases da memória aversiva no Teste de Medo Condicionado ao Contexto



1.6 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) tem importante papel em diversas funções biológicas, como por exemplo, no controle da pressão arterial, peristaltismo intestinal, ereção, entre outras (Lowenstein *et al.*, 1994; Moncada, 1994; Wang *et al.*, 2003). No SNC é considerado neurotransmissor atípico, pois é um gás, liberado após a ativação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em decorrência do influxo de cálcio após ativação do receptor de glutamato do tipo NMDA e, atua tanto no terminal pré-sináptico quanto pós-sináptico (Garthwaite, 1991; Wang *et al.*, 2004; Gulati *et al.*, 2017). Ele é sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual apresenta-se em três isoformas (Moncada e Higgs, 1993): a isoforma neuronal (nNOS) é expressa principalmente no SNC, enquanto que a isoforma endotelial (eNOS) está presente principalmente nas células endoteliais, ambas são expressas constitutivamente e possuem ativação dependente de cálcio intracelular (Bredt, 1999; Wang *et al.*, 2004; Guix *et al.*, 2005). A isoforma induzível (iNOS), por outro lado, é independente do influxo de cálcio e é expressa nos macrófagos e células da glia somente após um estímulo imunológico/inflamatório (Bredt, 1999; Guix *et al.*, 2005). Assim, um insulto inflamatório, como por exemplo o TNF- α , promove a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) que migra para o núcleo da célula e proporciona a transcrição gênica da iNOS (Rao, 2000).

De fato, a expressão da iNOS é desencadeada após estímulos inflamatórios, como por exemplo, a administração de LPS (Bredt, 1999; Guix *et al.*, 2005). A obesidade também leva ao desenvolvimento de um processo inflamatório crônico de baixo grau, ambos promovem a liberação de diversos mediadores inflamatórios periféricos, dentre eles o NO. Dados na literatura mostram que os níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (metabólitos do NO) estão aumentados na obesidade (Ghasemi *et al.*, 2013; Ghasemi e Jeddi, 2017). Além disso, há o aumento da expressão da iNOS em órgãos como rim, fígado e hipotálamo em animais obesos (Morley *et al.*, 1995; Fujimoto *et al.*, 2005).

O aumento de fatores inflamatórios periféricos está associado ao comportamento tipo ansiogênico e tipo depressivo (Hoogland *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016). Ainda, dados clínicos evidenciam a participação do NO na fisiopatologia de doenças relacionadas ao estresse, como depressão e TEPT (Oosthuizen *et al.*, 2005). Neste sentido, observa-se o aumento da expressão da nNOS e iNOS em regiões

encefálicas relacionadas à ansiedade após situações de estresse em animais (De-Oliveira e Guimaraes, 1999; Vila-Verde *et al.*, 2016).

Embora o NO exerça importantes funções fisiológicas, a exacerbação deste neurotransmissor está associada a comportamentos de ansiedade e depressão [para revisão (Guimaraes *et al.*, 2005)]. Neste sentido, a administração de doadores de NO e subsequente aumento da neurotransmissão desta via em regiões encefálicas responsáveis pelo controle de respostas defensivas, promove comportamento tipo ansiogênico ou do tipo pânico (Moreira *et al.*, 2004; Aguiar *et al.*, 2006; Braga *et al.*, 2009). Por outro lado, a inibição da nNOS induz efeito tipo ansiolítico (Guimaraes *et al.*, 1994; De-Oliveira e Guimaraes, 1999; Yildiz Akar *et al.*, 2007) e tipo antidepressivo em modelos animais (Jefferys e Funder, 1996; Yildiz *et al.*, 2000; Joca e Guimaraes, 2006; Spiacci *et al.*, 2008; Wegener e Volke, 2010; Montezuma *et al.*, 2012). Além disto, é observado que não apenas a nNOS está envolvida, mas a inibição da iNOS promoveu comportamento do tipo antidepressivo (Montezuma *et al.*, 2012) e redução da expressão de respostas aversivas no teste MCC (Fabri *et al.*, 2014; Lisboa *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016), sugerindo o envolvimento desta isoforma nas respostas emocionais mediadas pelo NO.

Por fim, recentemente dados do nosso grupo observaram que os efeitos associados à ansiedade após consumo crônico da dieta HC são dependentes do NO, provenientes da iNOS e não da nNOS (Gomes *et al.*, 2018). Estes dados sugerem que devido à expansão do tecido adiposo, ocorre aumento da expressão da iNOS e subsequente formação excessiva do NO em regiões encefálicas responsáveis pelo controle de comportamentos associados à ansiedade.

Diante do exposto acima, a compreensão da relação da obesidade e o envolvimento da via do NO sobre a expressão e extinção da memória aversiva torna-se relevante. Assim, a hipótese deste trabalho foi verificar as consequências da obesidade sobre estas respostas, através da avaliação da expressão e extinção da memória aversiva no teste de medo condicionado ao contexto e participação da iNOS em tais processos.

2 Objetivo geral

O objetivo principal deste estudo foi investigar a influência da obesidade sobre a expressão e extinção de memória aversiva no teste de medo condicionado ao contexto, em dois modelos experimentais: modelo genético de obesidade e induzido por dieta. Adicionalmente, avaliar o envolvimento do NO, proveniente da iNOS sobre estas respostas.

2.1 Objetivos específicos

Verificar o efeito da obesidade induzida por dieta de cafeteria em camundongos nas alterações comportamentais sobre a expressão e extinção da memória aversiva no teste do MCC.

- Analisar se há participação do NO, via iNOS, sobre estes comportamentos nos animais da dieta DCaf.

Verificar o efeito da obesidade em camundongos mutantes espontâneos para o receptor de leptina (*db/db*) sobre a expressão e extinção da resposta de medo no teste de medo condicionado ao contexto.

- Avaliar a participação do NO, via iNOS, nos comportamentos associados ao teste do MCC.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais experimentais

Neste estudo foram empregados dois modelos distintos de obesidade: um modelo genético e um modelo de obesidade induzida por dieta de cafeteria. No modelo genético foram utilizados camundongos C57 adultos (22-32 semanas de vida) mutante espontâneo para o receptor de leptina (*db/db*) e seu respectivo selvagem ($WT^{(+/?)}$), como grupo controle. Para os experimentos da obesidade induzida por dieta foram utilizados animais selvagens adultos desta mesma linhagem ($WT^{(+/?)}$, 15-19 semanas), alimentados com a dieta de cafeteria por 4 semanas. Todos os animais foram provenientes da colônia do departamento de Farmacologia da UFMG, com ciclo claro e escuro controlado em 12h e disponibilidade de água e comida *ad libitum*. Todos os animais foram expostos ao teste comportamental de medo condicionado ao contexto com duração de 8 dias.

Todo procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais [CEUA (protocolo 186/2018)].

3.2 Dieta Experimental

Os animais foram alimentados com dieta controle (Nuvilab CR1 ®), a qual possui 4,0 kcal/g, ou com a dieta de cafeteria (Oliveira *et al.*, 2017), sendo disponibilizadas duas variantes da ração simultaneamente, uma doce e uma salgada, com composição calórica de 4,87 kcal/g e 5,95 kcal/g, respectivamente. A caloria da dieta de cafeteria foi calculada a partir das informações publicadas em Oliveira *et al.* (2017) juntamente com as informações nutricionais obtidas no rótulo comercial dos produtos. Após 4 semanas do início da dieta os animais foram expostos ao teste comportamental e permaneceram recebendo a respectiva dieta até o final do experimento.

A dieta doce foi elaborada da seguinte forma: o biscoito tipo waffer foi triturado e misturado com o amendoim triturado e a ração em pó. O leite condensado e a água foram acrescentados lentamente até formar uma mistura homogênea. Para o preparo da dieta salgada os chips de batata foram triturados e misturados aos ingredientes secos, amendoim e ração em pó. Aos poucos foi adicionada a manteiga derretida aos

outros ingredientes até a obtenção de uma mistura homogênea. As duas variantes da massa foram divididas individualmente em pequenas bolas de ração para o armazenamento em congelador -20°C até o consumo, não excedendo o período de armazenamento de 3 meses.

Normalmente, a dieta de cafeteria é acompanhada de refrigerantes, no entanto, considerando que esses produtos contêm substâncias como cafeína e guaraná, que possuem propriedades psicoestimulantes (Campos *et al.*, 2005), podendo interferir no teste comportamental, foi substituído o uso de refrigerante por água açucarada contendo 10,48% de açúcar refinado UNIÃO®.

Quadro 1 - Ingredientes da dieta doce

Ingrediente	Marca	Quantidade (g)
Leite Condensado	Moça®	25
Amendoim torrado e moído	Pachá ou Yoki®	30
Biscoito recheado Waffer de chocolate	Aymoré®	25
Ração em pó	Nuvilab CR1®	20
Água		20 ml

Quadro 2 - Ingredientes da dieta salgada

Ingrediente	Marca	Quantidade (g)
Manteiga	Itambé®	30
Chips de batata frita	Ruffles®	25
Amendoim torrado e moído	Pachá ou Yoki®	25
Ração em pó	Nuvilab CR1®	20

3.3 Drogas

As drogas utilizadas foram aminoguanidina (inibidor preferencial da enzima iNOS, TOCRIS®) e N-(3-(aminometil)benzil)acetamidina (1400W, inibidor seletivo para iNOS, TOCRIS®). Ambas foram diluídas em solução salina estéril nas doses de 50 mg/kg e 0,5 µg/kg, respectivamente. As doses são equipotentes e foram calculadas de acordo com a constante de inibição (K_i) das drogas (Montezuma *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2018). As soluções foram injetadas intraperitonealmente 30 minutos antes da primeira reexposição à caixa (no dia 1) do teste do MCC. O volume foi fixado em 10 ml/kg do peso corporal.

3.4 Teste de Medo Condicionado ao Contexto (MCC)

O equipamento utilizado foi a caixa de medo condicionado ao contexto da marca Insight ®. A caixa de acrílico (28 x 26 x 23 cm) é constituída por um assoalho de metal conectado a um aparelho disparador de choques, o qual é possível regular a quantidade, intensidade e duração do estímulo. Os parâmetros foram padronizados em 3 choques randomizados com intensidade de 0,3 mA por 2 segundos cada.

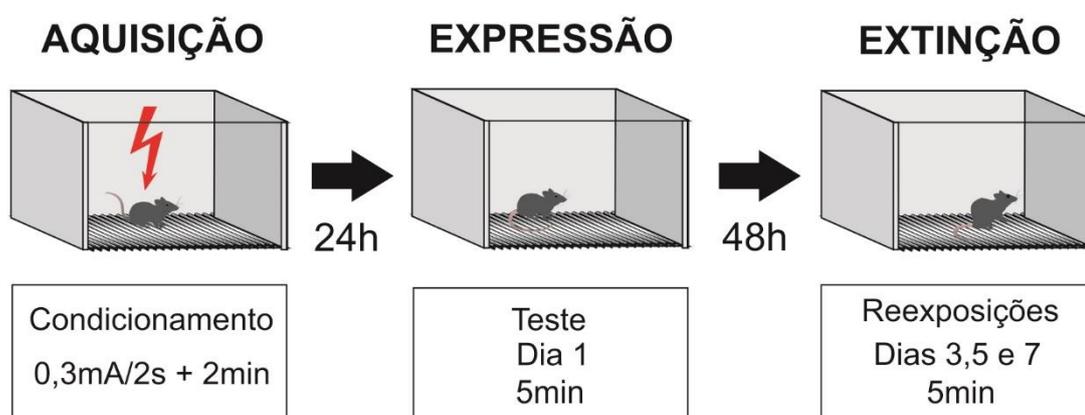
Para a aquisição da memória aversiva os animais foram expostos a sessão de condicionamento, onde os camundongos foram colocados individualmente na caixa (estímulo condicionado) e receberam os 3 choques inescapáveis (estímulo incondicionado) no período de 30, 90 e 130 segundos após a exposição inicial. Em seguida, os animais permaneceram na caixa por mais 2 minutos. A caixa experimental foi higienizada com álcool 30% e seca com papel higiênico antes de cada exposição. Para avaliação da expressão da resposta de medo condicionado ao contexto, após 24 horas, os animais foram reexpostos à caixa por 5 minutos, porém sem o estímulo aversivo do choque [Teste – Dia 1 (Figura 3)]. Durante esse período o comportamento dos animais foi filmado. Os vídeos foram analisados posteriormente pelo experimentador e tiveram o tempo de congelamento (imobilidade) determinado. Os animais eram considerados imóveis, ou em comportamento de congelamento, quando apresentavam apenas os movimentos involuntários, como por exemplo a respiração.

Para avaliar a extinção da memória aversiva contextual os animais foram reexpostos à caixa durante 5 minutos, novamente sem o choque, por mais 3 dias com intervalo de 48 horas, ou seja, nos dias 3, 5 e 7 após a aquisição (Figura 3). Como

mencionado anteriormente, o comportamento dos animais foi filmado por 5 minutos e analisado posteriormente pelo experimentador.

Após o procedimento experimental os animais foram sacrificados por decapitação para coleta do encéfalo e posterior análise de citocinas, leptina e nitrito. Nos animais da dieta de cafeteria, além do cérebro, foi dissecado tecido adiposo retroperitoneal, mesentérico e epididimal para análise do índice de adiposidade (IA).

Figura 3 - Esquema representativo do protocolo adotado no teste comportamental de medo condicionado ao contexto



3.5 Delineamento experimental

3.5.1 Efeito da obesidade induzida pela dieta de cafeteria sobre a expressão e extinção da memória aversiva no Teste do MCC e a participação da iNOS sobre estes comportamentos

Inicialmente os animais receberam a dieta de cafeteria ou dieta controle pelo período de 4 semanas. A seguir, foram submetidos ao Teste do MCC como descrito anteriormente e exemplificado na Figura 3. A distribuição dos animais no teste foi realizada de forma alternada.

Para avaliar a participação do NO sobre a expressão da memória aversiva os animais (DCaf e CT) foram submetidos à sessão de condicionamento e no dia do Teste (Dia 1) receberam injeção intraperitoneal de salina ou aminoguanidina (50 mg/kg) 30 minutos antes da primeira reexposição. Em todos os grupos foi aplicado o protocolo de extinção descrito anteriormente (reexposição à caixa nos dias 3, 5 e 7

subsequentes a aquisição).

3.5.2 Efeito da obesidade em animais *db/db* sobre a expressão e extinção da memória aversiva no Teste do MCC e a participação da iNOS sobre estes comportamentos

Os animais WT^(+/?) ou *db/db* foram submetidos ao teste comportamental de medo condicionado ao contexto como descrito na Figura 3.

A fim de verificar a participação do NO sobre o comportamento de ansiedade os animais receberam tratamento farmacológico com inibidores da iNOS. Nestes experimentos, como descrito anteriormente, os animais WT^(+/?) ou *db/db* foram divididos de forma randômica e submetidos à sessão de condicionamento. Posteriormente, no dia 1, foi administrado injeção intraperitoneal de salina ou inibidores de iNOS (aminoguanidina 50 mg/kg ou 1400W 0,5 µg/kg) 30 minutos antes do Teste. O protocolo de extinção foi repetido da mesma forma neste grupo experimental.

3.6 Índice de Adiposidade

Ao final dos experimentos relativos à dieta de cafeteria, os animais foram pesados e sacrificados, além disto, realizou-se o procedimento de dissecação do tecido adiposo epididimal (TAE), mesentérico (TAM) e retroperitoneal (TAR) para análise do índice de adiposidade (IA) calculada com a seguinte fórmula:

$$IA (\%) = (TAE + TAM + TAR) \times 100 / \text{Peso corporal total}$$

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software SPSS Statistics® versão 20 e no software GraphPad Prism® versão 5.01. Os dados referentes ao tempo de imobilidade foram analisados por ANOVA Multivariada de Medidas Repetidas seguida de pós teste de Bonferroni. Para análise do peso corporal e do índice de adiposidade foi realizado Teste *t Student* para dados com apenas dois grupos e ANOVA de uma via para mais de dois grupos. O nível de significância foi estabelecido com o valor de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Análise do peso corporal, tecido adiposo e índice de adiposidade dos animais submetidos à dieta CT ou DCaf

Os animais da dieta de cafeteria apresentaram ganho de peso ($t_{(9)} = 2,965$ $p < 0,0158$), juntamente com aumento expressivo em todos os tecidos adiposos, TAE ($t_{(9)} = 4,080$ $p < 0,0028$), TAM ($t_{(9)} = 2,681$ $p < 0,0252$) e TAR ($t_{(9)} = 6,790$ $p < 0,0001$) e no índice de adiposidade [IA ($t_{(9)} = 8,425$ $p < 0,0001$)], em relação aos animais da dieta controle (Tabela 1).

O grupo de animais da dieta de cafeteria que recebeu salina ou AMG50mg/kg também diferiu do controle salina tanto no peso ($F_{(3,37)} = 10,96$ $p < 0,0001$), quanto no TAE ($F_{(3,37)} = 38,91$ $p < 0,0001$), TAM ($F_{(3,37)} = 16,27$ $p < 0,0001$), TAR ($F_{(3,37)} = 49,16$ $p < 0,0001$) e IA ($F_{(3,37)} = 54,82$ $p < 0,0001$). O tratamento com aminoguanidina não influenciou em nenhum dos parâmetros analisados [CT salina x CT AMG: peso ($t_{(19)} = 0,6848$ $p > 0,50$), TAE ($t_{(19)} = 1,336$ $p > 0,19$), TAM ($t_{(19)} = 0,2757$ $p > 0,78$), TAR ($t_{(19)} = 2,088$ $p > 0,05$) e IA ($t_{(19)} = 1,155$ $p > 0,26$); DCaf salina x DCaf AMG: peso ($t_{(18)} = 0,9663$ $p > 0,34$), TAE ($t_{(18)} = 1,222$ $p > 0,23$), TAM ($t_{(18)} = 0,3988$ $p > 0,69$), TAR ($t_{(18)} = 1,284$ $p > 0,21$) e IA ($t_{(18)} = 1,099$ $p > 0,28$) Tabela 1].

Tabela 1 – Tecido adiposo, peso corporal e IA dos animais submetidos à dieta CT ou DCaf tratados ou não com salina ou AMG 50 mg/kg

	TAE (g)	TAM (g)	TAR (g)	Peso corporal (g)	IA (%)	
CT	0,48 ± 0,092	0,41 ± 0,043	0,11 ± 0,029	28,57 ± 0,609	3,47 ± 0,0024	n=3
DCaf	1,41 ± 0,131*	0,71 ± 0,065*	0,41 ± 0,025*	33,05 ± 0,871*	7,61 ± 0,0028*	n=8
CT Sal	0,56 ± 0,057	0,48 ± 0,033	0,15 ± 0,017	28,65 ± 0,831	4,11 ± 0,0027	n=10
CT AMG	0,47 ± 0,041	0,47 ± 0,024	0,10 ± 0,015	27,95 ± 0,617	3,72 ± 0,0021	n=11
DCaf Sal	1,27 ± 0,122*	0,72 ± 0,054*	0,41 ± 0,042*	32,16 ± 1,23*	7,41 ± 0,0037*	n=9
DCaf AMG	1,46 ± 0,092*	0,75 ± 0,041*	0,47 ± 0,029*	33,40 ± 0,589*	7,96 ± 0,0034*	n=11

CT= dieta controle; DCaf = dieta de cafeteria; CT Sal = dieta controle salina; CT AMG = dieta controle aminoguanidina; DCaf Sal = dieta de cafeteria salina; DCaf AMG = dieta de cafeteria aminoguanidina; TAE = tecido adiposo epididimal; TAM = tecido adiposo mesentérico; TAR = tecido adiposo retroperitoneal; IA = índice de adiposidade. Os valores representam a média ± E.P.M do peso dos animais. * p<0,05 em relação ao controle ou controle salina (Análise Teste *t* de *Student* para os grupos CT x DCaf e ANOVA de uma via seguida de pós teste de Bonferroni para os demais grupos).

4.2 – Análise do peso corporal dos animais WT^(+/?) e db/db

Os animais *db/db* possuem em média mais que o dobro do peso dos animais WT^(+/?) ($t_{(10)} = 12,92$ $p < 0,0001$). O tratamento com inibidores da iNOS não apresentou efeito sobre o peso dos animais [WT^(+/?) Salina x WT^(+/?) AMG ($t_{(11)} = 0,8925$ $p > 0,39$); WT^(+/?) Salina x WT^(+/?) 1400W ($t_{(16)} = 0,6409$ $p > 0,53$); *db/db* salina x *db/db* AMG ($t_{(11)} = 1,222$ $p > 0,24$); *db/db* salina x *db/db* 1400W ($t_{(14)} = 0,4222$ $p > 0,67$) Tabela 2].

Tabela 2 – Peso médio dos animais WT^(+/?) e *db/db* tratados ou não com inibidores da iNOS

	Peso corporal (g)	
WT^(+/?)	28,67 ± 1.807	n=6
<i>db/db</i>	59,98 ± 1.615*	n=6
WT^(+/?) Sal	27,14 ± 1.094	n=6
WT^(+/?) AMG	28,72 ± 1.345	n=7
<i>db/db</i> Sal	63,21 ± 1.570*	n=6
<i>db/db</i> AMG	58,83 ± 3.017*	n=7
WT^(+/?) Sal	28,47 ± 0.4930	n=8
WT^(+/?) 1400W	29,15 ± 0.8588	n=10
<i>db/db</i> Sal	59,23 ± 1.438*	n=8
<i>db/db</i> 1400W	60,08 ± 1.430*	n=8

WT^(+/?) Sal = animais selvagem salina; WT^(+/?) AMG = animais selvagem aminoguanidina; WT^(+/?) 1400W = animais selvagem 1400W e *db/db* Sal = animais *db/db* salina; *db/db* AMG = animais *db/db* aminoguanidina; *db/db* 1400W = animais *db/db* 1400W. Os valores representam a média ± E.P.M. do peso dos animais * $p < 0,05$ em relação ao selvagem ou selvagem salina (Análise Teste *t* de Student para os grupos WT^(+/?) x *db/db* e ANOVA de uma via seguida de pós teste de Bonferroni para os demais grupos).

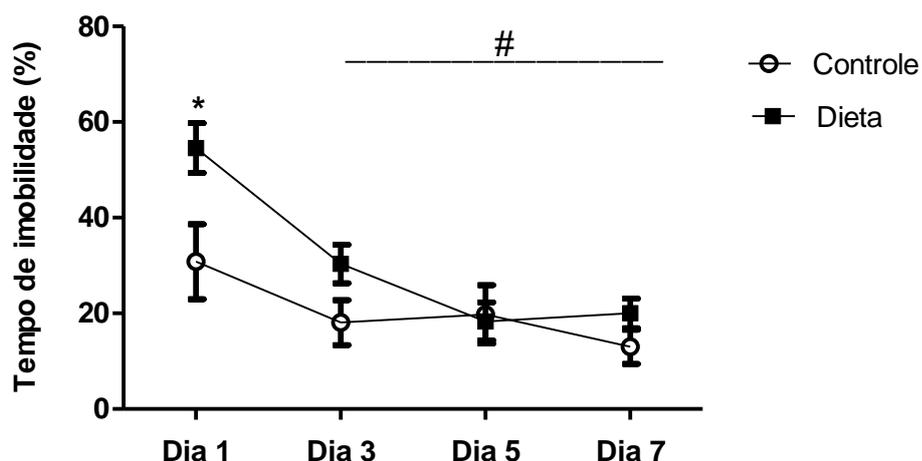
4.3 Teste comportamental

4.3.1 Análise comportamental no teste do MCC dos animais submetidos à dieta CT ou DCaf tratados ou não com AMG 50 mg/kg

Conforme apresentado na Figura 4, os animais da dieta de cafeteria apresentaram maior imobilidade no dia 1 comparado aos animais controle (fator Dia $F_{(3,11)} = 27,95$ $p < 0,0001$; fator Dia x Dieta $F_{(1,11)} = 3,27$ $p = 0,09$, fator interação Dia x Dieta $F_{(3,11)} = 5,57$ $p = 0,0003$). Ambos os grupos foram capazes de extinguir a memória aversiva a partir do dia 3 (Bonferroni $p < 0,05$, Figura 4).

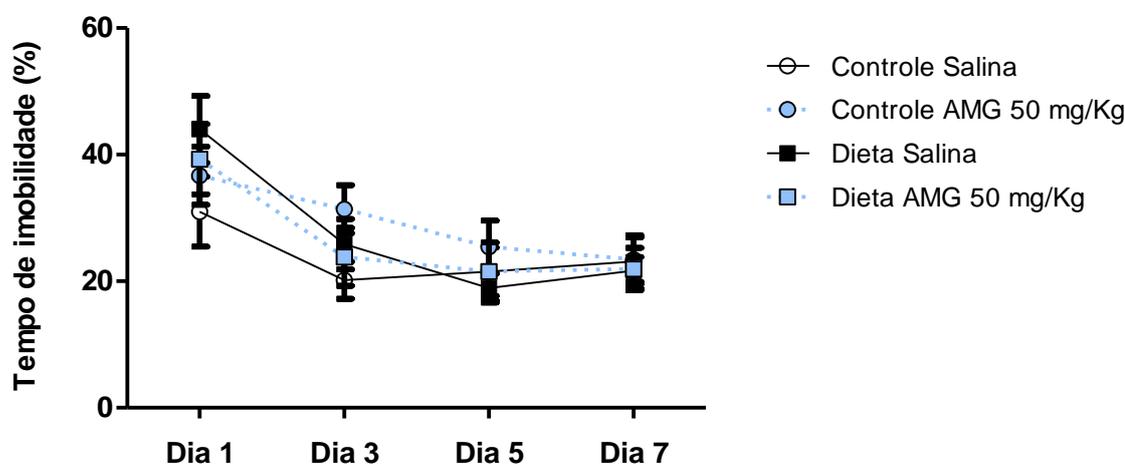
Repetimos a dieta de cafeteria em um novo grupo de animais para verificar se os efeitos observados na Figura 4 eram decorrentes da exacerbação do NO. Nesse segundo experimento, não observamos aumento na expressão da memória aversiva nos animais que receberam DCaf salina em relação ao grupo controle (fator Dia $F_{(1,35)} = 21,96$ $p = 0,001$; fator Dia x Droga $F_{(1,35)} = 0,14$ $p = 0,71$; fator Dia x Dieta $F_{(1,35)} = 2,76$ $p = 0,1$, fator interação Dia x Droga x Dieta $F_{(1,35)} = 1,10$ $p = 0,30$, Figura 5). O pré-tratamento com aminoguanidina 50 mg/kg não alterou o comportamento dos animais.

Figura 4 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais submetidos à dieta CT ou DCaf nos dias 1, 3, 5 e 7



Cada ponto representa a média \pm E.P.M da porcentagem do tempo de imobilidade do animal. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dieta controle e # $p < 0,05$ em relação ao dia 1. $n = 5-8$ animais/grupo. (ANOVA Multivariada de Medidas Repetidas seguida do pós teste Bonferroni)

Figura 5 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais da dieta CT ou DCaf que receberam salina ou AMG 50 mg/kg



Cada ponto representa média \pm E.P.M da porcentagem do tempo de imobilidade do animal. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle salina e # $p < 0,05$ diferença em relação ao dia 1. $n = 10-11$ animais/grupo. (ANOVA Multivariada de Medidas Repetidas seguida do pós teste Bonferroni)

4.3.2 Análise comportamental no teste do MCC dos animais $WT^{(+/?)}$ e db/db tratados ou não com inibidores da iNOS

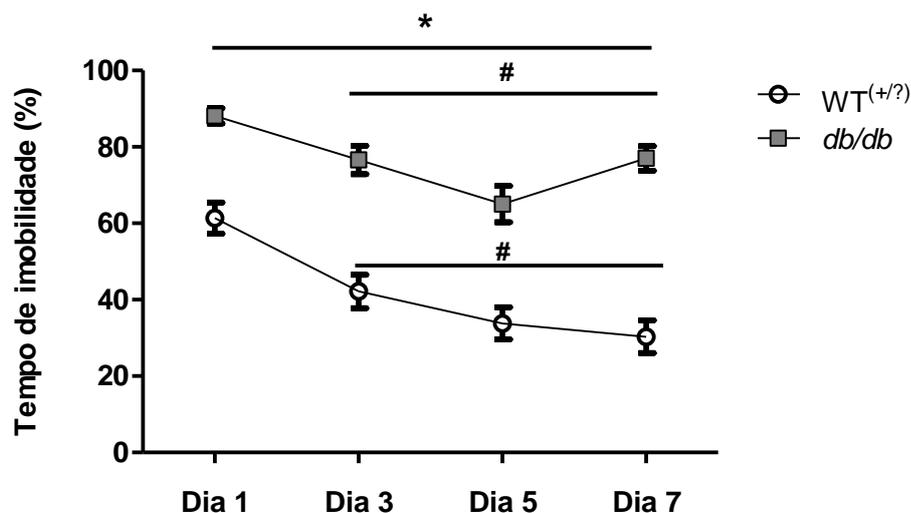
No presente estudo os animais db/db apresentaram aumento no tempo de imobilidade em relação os animais $WT^{(+/?)}$ em todos os dias (fator Dia $F_{(3,17)} = 33,88$ $p < 0,0001$; fator Genótipo $F_{(1,17)} = 59,03$ $p < 0,0001$; fator interação Dia x Genótipo $F_{(3,17)} = 5,07$ $p = 0,003$). Houve redução deste comportamento ao longo do tempo em relação ao dia 1 em ambos grupos (Bonferroni $p < 0,05$, Figura 6). Porém, os animais db/db apresentaram prejuízo na extinção da memória aversiva em relação aos animais controles (Bonferroni $p < 0,005$, Figura 6).

Nos dois experimentos subsequentes avaliamos o envolvimento do NO na expressão da resposta aversiva no MCC. Inicialmente verificamos o efeito do pré-tratamento da aminoguanidina 50 mg/kg. Como observado no experimento anterior, os animais db/db apresentaram maior tempo de imobilidade no dia do teste (fator Dia $F_{(1,22)} = 30,73$ $p < 0,001$; fator Genótipo $F_{(1,22)} = 38,31$ $p < 0,0001$; fator Dia x Droga $F_{(1,22)} = 0,007$ $p = 0,93$, fator Dia x Genótipo $F_{(1,22)} = 0,158$ $p = 0,69$, fator Dia x Genótipo x Droga $F_{(1,22)} = 0,001$ $p = 0,972$; Figura 7) e prejuízo da extinção em comparação aos animais

WT^(+/?) salina. O pré-tratamento com aminoguanidina não modificou os parâmetros observados (Bonferroni $p > 0,05$; Figura 7).

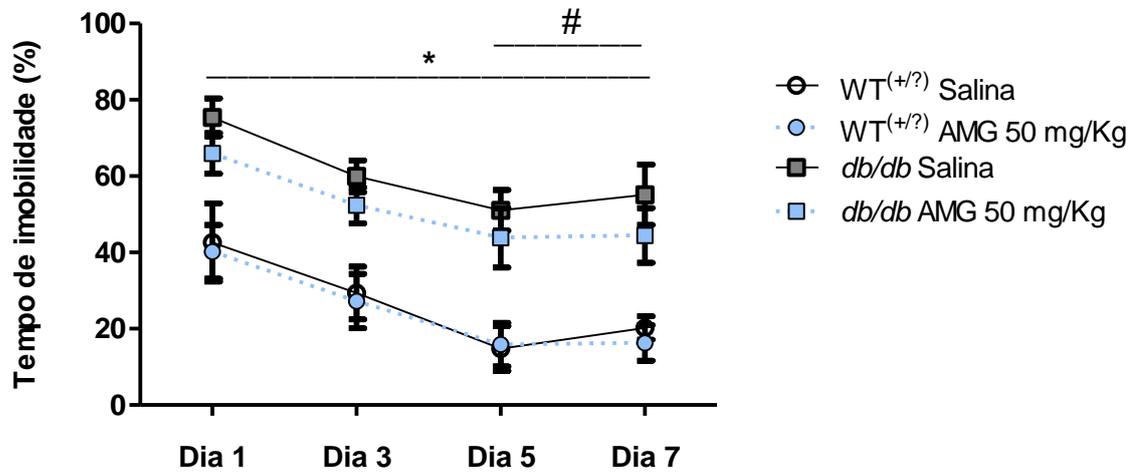
Além da aminoguanidina, verificamos também o efeito do pré-tratamento com um inibidor seletivo da iNOS, o 1400W. Semelhante ao observado nos experimentos anteriores, os animais *db/db* permaneceram tempo significativamente maior no dia do teste e apresentaram prejuízo na resposta de extinção quando comparado aos animais WT^(+/?) salina (fator Dia $F_{(1,29)} = 27,09$ $p < 0,001$, fator Genótipo $F_{(1,29)} = 48,74$ $p < 0,001$, fator Dia x Droga $F_{(1,29)} = 0,1$ $p = 0,75$, fator Dia x Genótipo $F_{(1,29)} = 0,92$ $p = 0,35$, fator Dia x Droga x Genótipo $F_{(1,29)} = 0,09$ $p = 0,76$; Figura 8). Nesse experimento, observamos que os animais WT^(+/?) que receberam 1400W apresentaram facilitação na extinção da memória aversiva em relação ao dia 1 (Bonferroni, $p < 0,05$; Figura 8).

Figura 6 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais WT^(+/?) ou *db/db* nos dias 1, 3, 5 e 7



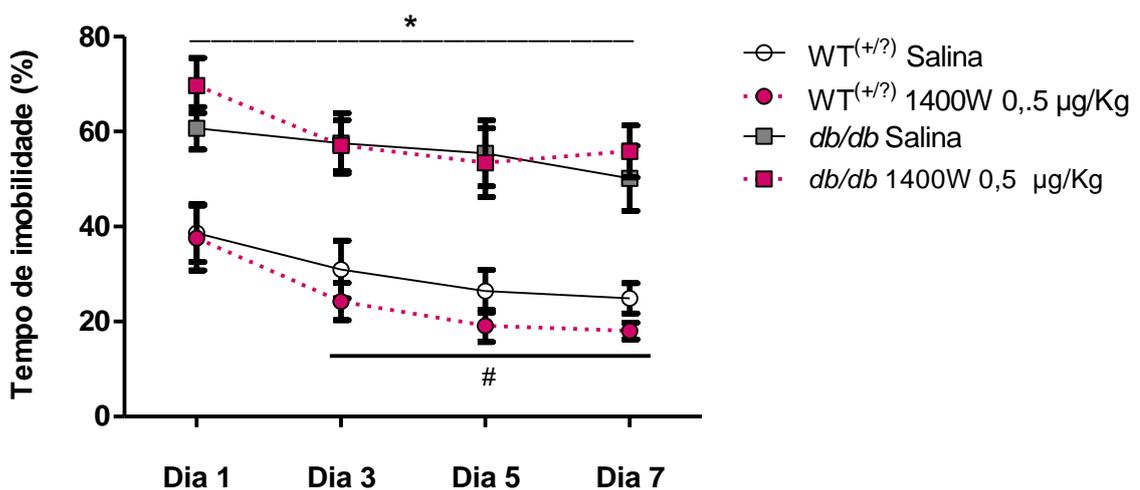
Cada ponto representa média \pm E.P.M da porcentagem do tempo de imobilidade do animal. * $p < 0,05$ em relação ao grupo WT^(+/?), # $p < 0,05$ em relação ao dia 1 (ANOVA Multivariada de Medidas Repetidas seguida do pós teste Bonferroni) $n = 9-10$ animais/grupo.

Figura 7 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais WT^(+/?) ou *db/db* tratados com salina ou AMG 50 mg/kg



Cada ponto representa média \pm E.P.M da porcentagem do tempo de imobilidade do animal nos dias 1, 3, 5 e 7. * $p < 0,05$ em relação ao grupo WT^(+/?) salina e # $p < 0,05$ diferença em relação ao dia 1 (ANOVA Multivariada de Medidas Repetidas seguida do pós teste Bonferroni) $n = 6-7$ animais/grupo.

Figura 8 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais WT^(+/?) ou *db/db* tratados com salina ou 1400W 0,5 μ g/Kg



Cada ponto representa média \pm E.P.M da porcentagem do tempo de imobilidade do animal nos dias 1, 3, 5 e 7. * $p < 0,05$ em relação ao grupo WT^(+/?) Salina, # $p < 0,05$ diferença em relação ao dia 1 (ANOVA Multivariada de Medidas Repetidas seguida do pós teste Bonferroni) $n = 8-10$ animais/grupo

5 Discussão

No presente estudo observamos que ambos modelos utilizados promoveram obesidade nos animais, sendo esse efeito mais pronunciado nos animais *db/db* em relação aos animais da DCaf. Tal afirmação baseia-se no fato de que, embora os animais da DCaf tivessem um alto índice de adiposidade, apresentaram pequena variação no peso corporal. Nossos dados estão em consonância com os dados da literatura, que mostram que tanto a dieta de cafeteria quanto os animais *db/db* induzem obesidade, em decorrência da expansão exacerbada do tecido adiposo (Carillon *et al.*, 2013; Reichelt *et al.*, 2015; Gil-Cardoso *et al.*, 2017).

Na DCaf, podemos sugerir que tais alterações foram observadas pelo fato de que os macronutrientes da dieta influenciam na adiposidade corporal e no ganho de peso tanto em humanos como em modelos experimentais (Chaput *et al.*, 2012; Darling *et al.*, 2013; Darbre, 2017). Nesse caso, os picos na liberação de insulina, provocados pelo excesso do consumo de carboidrato, e a produção de enzimas lipogênicas, induzidas por lipídeos, favorecem o acúmulo prejudicial de gordura e conseqüentemente, o ganho de peso associado ao aumento da adiposidade (Sampey *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2015; Zeeni *et al.*, 2015). Nos animais *db/db* o fenótipo obeso é desencadeado em decorrência da falta de sinalização da leptina e pelo fato deste hormônio exercer um papel fundamental sobre o balanço energético, tendo ação anorexígena no hipotálamo (Campfield *et al.*, 1995). Nos dois casos o aumento prejudicial do tecido adiposo induz o desenvolvimento não só de obesidade, como também favorece outras comorbidades, incluindo os transtornos psiquiátricos (Lopresti e Drummond, 2013; Mansur *et al.*, 2014). Assim, são vários os estudos que verificam a influência dos diferentes modelos de obesidade e as composições dietéticas sobre os comportamentos associados à ansiedade e depressão (Ferreira *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018; Woodie e Blythe, 2018). Neste estudo avaliamos a expressão e extinção da memória aversiva em animais obesos submetidos ao teste do MCC.

Inicialmente, observamos que os animais da dieta DCaf exibiram comportamento tipo ansiogênico, verificado pelo aumento do tempo de imobilidade no dia do Teste e não tiveram prejuízo na extinção da memória aversiva. Porém, o comportamento do tipo ansiogênico deixou de ser observado no experimento

subsequente. Assim, podemos sugerir que os animais submetidos a DCaf apresentaram dois perfis de resposta comportamental.

Além da dieta DCaf, o mesmo perfil de comportamento foi observado em camundongos Balb-C tratados com dieta rica em carboidrato [HC (Apêndice)]. A proposta inicial dessa dissertação era avaliar a extinção da resposta aversiva nos animais tratados com dieta HC por 12 semanas. Tal proposta foi baseada em dados prévios do nosso grupo, que descreveram efeito ansiogênico no teste MCC após consumo crônico da dieta HC (Santos *et al.*, 2018). No entanto, durante a execução dos experimentos não foi observado um padrão na resposta comportamental (Apêndice). Considerando-se os dados prévios do grupo, e por inicialmente a resposta observada também ter sido ansiogênica, acreditou-se que a ausência de resposta estava associada a uma falha metodológica nos experimentos subsequentes. Assim, optamos por utilizar outro modelo de obesidade induzida por dieta nos camundongos C57 eutróficos da linhagem *db/db*.

Ao analisarmos os nossos grupos experimentais de animais expostos à DCaf ou dieta HC, podemos inferir que essas dietas não promovem resposta comportamental única, pois dois padrões distintos de comportamentos foram observados. Essa discrepância entre os dados após o consumo de dietas obesogênicas também é descrita na literatura (Morley *et al.*, 1995; Sobesky *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015; Baker e Reichelt, 2016; Ferreira *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018; Woodie e Blythe, 2018). Leffa *et al.* (2015) observaram efeito do tipo ansiolítico no teste do labirinto em cruz em camundongos Swiss, após tratamento crônico com a DCaf (Leffa *et al.*, 2015). Esse efeito também foi observado por Yamada-Goto *et al.* (2012) e Reichelt *et al.* (2015), os quais descreveram efeitos do tipo ansiolítico no teste do MCC e prejuízo na aquisição da memória aversiva e espacial (Yamada-Goto *et al.*, 2012; Reichelt *et al.*, 2015). Por outro lado, a DCaf não modificou os parâmetros associados à ansiedade ou memória em ratos *Wistar* que receberam a dieta pelo período de 8 semanas (Ferreira *et al.*, 2018).

Assim, outros fatores além do aumento da adiposidade, como por exemplo, os fatores genéticos, alterações bioquímicas e microbiota influenciariam a resposta comportamental dos animais e promoveriam respostas distintas. Nesse sentido, é descrito na literatura que animais da mesma linhagem, porém com microbiotas diferentes apresentam alterações distintas no metabolismo e nas respostas

comportamentais de ansiedade e memória (Beilharz *et al.*, 2016). Outro fator intrínseco que pode variar entre os indivíduos é o remodelamento do TA em decorrência da obesidade. Estudos mostram que a organização do TA branco também é fundamental no metabolismo e fisiopatologia da obesidade levando à diferentes prognósticos (Luo e Liu, 2016; Reilly e Saltiel, 2017). Em uma situação onde a expansão do TA ocorre principalmente pelo remodelamento com perfil hiperplásico, ou seja, onde há proliferação de adipócitos menores com crescimento no número de células e maior vascularização, há menos apoptose e menor produção de citocinas pró-inflamatórias e, como consequência, todas comorbidades associadas à obesidade estão reduzidas (Luo e Liu, 2016; Reilly e Saltiel, 2017). No entanto, em um quadro onde há hipertrofia do TA, ou seja, não há aumento na quantidade de células, apenas crescimento do adipócito já existente, este órgão apresenta baixa vascularização, maior morte celular e produção de citocinas pró-inflamatórias e consequentemente um pior prognóstico (Luo e Liu, 2016; Reilly e Saltiel, 2017). No presente estudo não foi avaliado o perfil de remodelamento do tecido adiposo em cada grupo de animais alimentados com as diferentes dietas e a microbiota não foi controlada. Assim, não podemos excluir a influência destes fatores no metabolismo dos animais e consequente efeito na resposta comportamental.

Além disso, a sazonalidade induz e reprime a expressão gênica e respostas bioquímicas adaptativas, como liberação de fatores que controlam o metabolismo, fatores pró e anti-inflamatórios, e, consequentemente, altera a adiposidade e metabolismo (Sonna *et al.*, 2002; Kern *et al.*, 2014; Finlin *et al.*, 2017); dessa forma regula funções fisiológicas básicas como a reprodução (Hazlerigg e Simonneaux, 2015), liberação de hormônios (Rigano *et al.*, 2017) e alterações hemodinâmicas (Radke e Izzo, 2010). Os roedores são sensíveis a pequenas variações de temperatura, apesar da temperatura média no biotério e na sala de experimentação serem relativamente controladas, pequena alteração no clima pode influenciar no comportamento dos roedores (Maher *et al.*, 2015). Fator que não foi avaliado no dia dos experimentos e poderia ser responsável pelas divergências encontradas neste estudo.

Outro fator a ser considerado é que os animais da dieta de cafeteria foram selecionados apenas pelo fenótipo eutrófico, ou seja, sem alteração no peso. Não realizamos genotipagem dos animais para diferenciá-los entre animais heterozigotos (*db/+*) e homozigotos dominante (*+/+*). Assim, não sabemos se há diferença no

metabolismo e/ou no comportamento em animais com mesmo fenótipo, porém com genótipo diferente. A maioria dos estudos que utilizam a linhagem *db/db* não fazem distinção entre os animais eutróficos (Dinel *et al.*, 2011; Ernst *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2013; Guo e Lu, 2014; Fourrier *et al.*, 2019). Platt *et al.* (2016) avaliaram o desenvolvimento da patologia Tau, doença neurodegenerativa, em camundongos obesos *db/db* e eutróficos diferenciando o genótipo [WT heterozigoto (*db/+*) e homozigoto (+/+)]. Os animais selvagem heterozigotos e homozigotos apresentaram comportamento semelhante, embora, segundo os autores, foi observada uma pequena vantagem (diferença estatisticamente não significativa) na memória espacial no teste de labirinto de água de Morris nos animais WT heterozigotos (*db/+*) em relação às outras duas linhagens [+/+ e *db/db* (Platt *et al.*, 2016)]. Apesar do estudo citado acima, não é possível concluir, em nossos dados, se as respostas observadas seriam decorrentes da diferença genética nos animais eutróficos. Para avaliar estes parâmetros é necessário fazer a genotipagem dos animais e correlacionar com parâmetros metabólicos provocados pela dieta de cafeteria e com o comportamento.

Os estudos supracitados mostram que o perfil de resposta comportamental pode variar entre os animais obesos. Essas diferenças podem estar associadas ainda a outros fatores que não foram mencionados, como a idade do animal no início da dieta e/ou durante o teste comportamental, tempo de tratamento e composição da dieta, entre outros fatores como alterações bioquímicas e hormonais provocadas pela obesidade e/ou pelas dietas (Pati *et al.*, 2018)

Ainda vale ressaltar que as dietas DCaf e HC utilizadas nesse trabalho foram desenvolvidas com ingredientes, calorias e proporções da composição nutricional distintos (dieta HC isocalórica x DCaf hipercalórica). Além do tempo de dieta ter sido diferente nos dois casos. Apesar dessas diferenças, ambas promovem padrão de resposta metabólica periférica e aumento de citocinas inflamatórias, como TNF- α periférico (Oliveira *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2017). No entanto, não podemos afirmar se a inflamação periférica estaria associada com uma resposta neuroinflamatória em regiões associadas a ansiedade. Outro fator importante é, as dietas empregadas foram utilizadas em animais de linhagens distintas [Balb-C (DHC) e C57 (DCaf)], dificultando a afirmação de que essas duas dietas provocam exatamente as mesmas alterações metabólicas e bioquímicas nos animais. Porém, ressalta-se que ambas provocaram o mesmo perfil de resposta comportamental no teste de MCC.

Além dos efeitos da obesidade promovida pela dieta, nós também avaliamos a resposta comportamental no teste do MCC em um modelo genético de obesidade. Observamos que os animais *db/db* apresentaram comportamento do tipo ansiogênico e prejuízo na extinção da memória aversiva, sugerindo maior susceptibilidade ao estresse. Corroborando dados na literatura que mostram, como mencionado anteriormente, que a leptina além de desempenhar funções sobre o balanço energético apresenta importante papel sobre comportamento de ansiedade e depressão (Liu *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). Adicionalmente, sabe-se que o prejuízo na via de sinalização da leptina pode levar ao comportamento tipo ansiogênico no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) em animais *db/db* (Zhao *et al.*, 2012), embora Sharma *et al.*, 2010 tenham descrito efeito ansiolítico neste mesmo teste. Possivelmente a divergência na resposta de ansiedade entre os trabalhos citados acima está associada ao estresse causado previamente nos animais *db/db*, pois ambos utilizaram animais adultos com idade semelhante, 10-11 semanas (Zhao *et al.*, 2012) e 13 semanas (Sharma *et al.*, 2010), entretanto, Zhao *et al.* (2012) manipularam os animais com administração de veículo a partir da 9ª semana de vida. No presente estudo os animais são estressados com o choque no teste MCC, juntamente com as observações citadas acima, pode-se sugerir que os animais *db/db* adultos são mais susceptíveis ao estresse.

Assim, alguns fatores devem ser considerados como o protocolo adotado e idade em que o animal foi exposto ao teste. Nesse sentido, estudos demonstraram alterações fisiológicas e comportamentais em animais *db/db* em diferentes idades (Sallam *et al.*, 2011; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2014). Ramos-Rodriguez *et al.* (2014) observaram diferenças bioquímicas em animais *db/db* com 4, 14 e 26 semanas de vida. Nos animais *db/db* há aumento da inflamação sistêmica comparado ao selvagem, e em animais *db/db* idosos há aumento da inflamação crônica, estresse oxidativo, lipoproteína de baixa densidade (LDL), colesterol, triglicerídeos e glicemia, o que indica alterações metabólicas acentuadas comparado ao animal *db/db* adulto jovem. Ou seja, as alterações nos animais *db/db* são mais acentuadas nos animais idosos que nos animais jovens, acarretando diferentes prognósticos em fases de vida distintas (Sallam *et al.*, 2011). No presente estudo o teste comportamental foi executado em animais adultos mais velhos, 22-32 semanas de vida, fator que pode determinar as respostas comportamentais observadas.

Como mencionado anteriormente, a expansão nociva do tecido adiposo está

associada com um processo inflamatório crônico de baixo grau (Saltiel e Olefsky, 2017), sendo que parte dessa inflamação sistêmica origina-se no próprio tecido adiposo e os mediadores ali produzidos podem atingir o encéfalo através de diferentes mecanismos (por exemplo, inervação vagal ou órgãos circumventriculares) e desencadear uma resposta neuroinflamatória (Reus *et al.*, 2015). Nessa situação, as células microgliais facilitam a resposta neuroinflamatória promovendo disfunções no SNC, incluindo alterações comportamentais (Cai, 2013; Aguilar-Valles *et al.*, 2015; Reus *et al.*, 2015)

Uma das moléculas inflamatórias que se apresenta exacerbada em decorrência da ativação microglial é o NO, o qual é liberado após a ativação da iNOS em processos de insultos inflamatórios (Rao, 2000). A exacerbção do NO induz comportamentos tipo ansiedade e tipo pânico em animais (Moreira *et al.*, 2004; Aguiar e Guimaraes, 2009; Fogaça *et al.*, 2012; Aguiar *et al.*, 2014). Por outro lado, a inibição da enzima NOS está associada a respostas do tipo ansiolíticas (Guimaraes *et al.*, 1994; Guimaraes *et al.*, 2005). Dados prévios do nosso grupo, observaram aumento da iNOS, mas não da nNOS, após consumo crônico com a dieta HC (Gomes *et al.*, 2018). Além disto, observaram redução do comportamento tipo compulsivo no teste de enterrar esferas após administração periférica de AMG 50mg/kg 30 minutos antes do teste, sugerindo a participação desta isoforma nas alterações comportamentais promovidas pelo consumo crônico da dieta HC (Gomes *et al.*, 2018).

Assim, avaliamos também a participação da iNOS sobre os comportamentos de medo e extinção da memória aversiva nos animais obesos. Utilizamos uma dose sublimiar de inibidores da iNOS a fim de garantir que a droga exerceria seu efeito apenas em animais cuja enzima está aumentada. Como mencionado acima, a dose de AMG 50mg/kg mostrou efeito em animais da dieta HC em outro teste comportamental (Gomes *et al.*, 2018), sugerindo que esta dose é suficiente para exercer efeito. Entretanto, neste estudo o pré-tratamento com inibidores da iNOS não foi capaz de reverter as alterações comportamentais nos animais obesos no teste MCC. Especificamente, nos animais da dieta de cafeteria, o grupo DCaf salina não diferiu dos animais que receberam a dieta controle salina, dificultando a interpretação do efeito da aminoguanidina neste experimento, pois não é possível inferir se há participação dessa via em animais DCaf cuja resposta está exacerbada.

Nos camundongos *db/db* observamos que a inibição da iNOS, seja com um inibidor preferencial ou um seletivo da enzima, não reverteu o comportamento de

ansiedade e o prejuízo da extinção da memória aversiva no MCC, sugerindo que apenas a inibição aguda da iNOS não foi capaz de reverter a resposta de ansiedade e prejuízo na extinção da memória aversiva. Recentemente, Becerril *et al.* (2018) observaram que a deleção do gene da iNOS em camundongos geneticamente modificados para a leptina (*ob/ob*) foi capaz de reverter a inflamação e fibrose do tecido adiposo. Além disso, os autores observaram que a ativação da iNOS pela leptina é necessária para a resposta inflamatória observada no tecido adiposo (Becerril *et al.*, 2018). Assim, considerando que nos animais *db/db* a obesidade instalada é de um grau elevado, possivelmente a inibição prolongada da iNOS ou a deleção do gene da iNOS seria capaz de reverter as alterações comportamentais observadas. No entanto, essa hipótese ainda precisa ser verificada.

Ainda, dados na literatura mostram que os animais *db/db* apresentam alterações hormonais como por exemplo, aumento de glicocorticoides (Dey *et al.*, 2014; Wosiski-Kuhn *et al.*, 2014; Catorce e Gevorkian, 2016). A resposta exacerbada aos glicocorticoides está associada aos comportamentos do tipo ansiedade e prejuízo na memória (Sorrells *et al.*, 2009). Fisiologicamente, os glicocorticoides são hormônios com função imunossupressora e controlam o balanço energético, além disto, estão envolvidos no estresse, no comportamento defensivo e contribuem com alterações na plasticidade sináptica, cognição e memória (Drexler *et al.*, 2015; Mainardi *et al.*, 2015). Quando há exacerbação da liberação de glicocorticoides estas funções são comprometidas, apresentando aumento da resposta imune inflamatória, comprometimento da plasticidade sináptica, memória e favorecimento do comportamento tipo ansiogênico (Sorrells *et al.*, 2009; Boitard *et al.*, 2015). Estudos mostram a relação do aumento de corticosterona em animais *db/db* com prejuízo da memória espacial, redução de BDNF e de espinhas dendríticas, o que indica prejuízo na plasticidade neural e sináptica (Wosiski-Kuhn *et al.*, 2014). Dey *et al.* (2014) mostraram que a inibição da síntese de corticosterona reduz fatores pró-inflamatórios IL-1 β e TNF- α , quantidade de micróglia no hipocampo, peso corporal, TA epididimal, glicemia, tolerância à glicose, e aumenta a sensibilidade à insulina em camundongos obesos *db/db* (Dey *et al.*, 2014). Todas estas alterações mostram que o aumento da corticosterona induz neuroinflamação, prejudica a memória, plasticidade sináptica estrutural e funcional em animais *db/db* (Dey *et al.*, 2014; Wosiski-Kuhn *et al.*, 2014). Sendo assim, podemos sugerir que as alterações comportamentais observadas em nosso trabalho poderiam estar associadas ao envolvimento deste hormônio na

modulação da resposta de ansiedade e preservação da memória aversiva no MCC.

Por fim, vale ressaltar que todos os parâmetros do teste de MCC, como quantidade e intensidade do choque, manipulação do animal com a injeção 30 minutos antes do Teste e a dose das drogas (AMG e 1400W), foram padronizadas previamente nas duas linhagens. E, devido à ausência de padrão nos animais da dieta HC (Apêndice) novas padronizações foram realizadas de acordo com a necessidade de mudança no protocolo.

6 Conclusão

O tratamento com a dieta de cafeteria foi capaz de induzir obesidade nos camundongos C57 e provocar perfis distintos de resposta comportamental no teste do MCC. Este padrão de resposta também foi observado nos animais da dieta rica em carboidrato (HC). Nesse trabalho, não foi possível identificar os fatores responsáveis por estas respostas comportamentais. Os animais foram selecionados apenas pelo fenótipo eutrófico ($WT^{(+/?)}$), não foi avaliado o genótipo e sua relação com o metabolismo na dieta de cafeteria e/ou relativo ao comportamento de medo. Além disso, tivemos a limitação de não controlar outras variáveis como microbiota e avaliação do perfil de remodelamento do tecido adiposo.

Os animais *db/db* apresentaram comportamento ansiogênico no MCC e prejuízo na extinção da memória aversiva. A inibição aguda da iNOS não foi capaz de prevenir tais alterações, sugerindo que há participação de outros mecanismos nas alterações comportamentais observadas nos animais *db/db*.

Referências bibliográficas

ABESO. Associação Brasileira para o Estudo de Obesidade da Síndrome Metabólica. 2016.

AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 11, p. 2418-29, Aug 15 2009. ISSN 1097-4547 (Electronic) 0360-4012 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360885> >.

AGUIAR, D. C. et al. The dorsolateral periaqueductal grey N-methyl-D-aspartate/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway modulates the expression of contextual fear conditioning in rats. **J Psychopharmacol**, v. 28, n. 5, p. 479-85, May 2014. ISSN 1461-7285 (Electronic) 0269-8811 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24008812> >.

AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A.; GUIMARAES, F. S. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-d-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, n. 2, p. 296-301, Feb 2006. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16546244> >.

AGUILAR-VALLES, A. et al. Obesity, adipokines and neuroinflammation. **Neuropharmacology**, v. 96, n. Pt A, p. 124-34, Sep 2015. ISSN 1873-7064 (Electronic) 0028-3908 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25582291> >.

AHL, J. The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. **Behavioural Brain Research**, v. 149, n. 1, p. 17-31, 2004. ISSN 01664328.

BAKER, K. D.; REICHEL, A. C. Impaired fear extinction retention and increased anxiety-like behaviours induced by limited daily access to a high-fat/high-sugar diet in male rats: Implications for diet-induced prefrontal cortex dysregulation. **Neurobiol Learn Mem**, v. 136, p. 127-138, Dec 2016. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27720810> >.

BECERRIL, S. et al. Targeted disruption of the iNOS gene improves adipose tissue inflammation and fibrosis in leptin-deficient ob/ob mice: role of tenascin C. **Int J Obes (Lond)**, v. 42, n. 8, p. 1458-1470, Aug 2018. ISSN 1476-5497 (Electronic) 0307-0565 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29449623> >.

BEILHARZ, J. E. et al. The effect of short-term exposure to energy-matched diets enriched in fat or sugar on memory, gut microbiota and markers of brain inflammation and plasticity. **Brain Behav Immun**, v. 57, p. 304-313, Oct 2016. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27448745> >.

BHUPATHIRAJU, S. N.; HU, F. B. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. **Circ Res**, v. 118, n. 11, p. 1723-35, May 27 2016. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27230638> >.

BHUPATHIRAJU, S. N.; WILLET, W. C.; HU, F. B. Body Mass Index and All-Cause Mortality. **JAMA**, v. 316, n. 9, p. 991, Sep 6 2016. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27599336> >.

BOITARD, C. et al. Juvenile obesity enhances emotional memory and amygdala plasticity through glucocorticoids. **J Neurosci**, v. 35, n. 9, p. 4092-103, Mar 4 2015. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25740536> >.

BOURLIER, V. et al. Collective and experimental research project for master's students on the pathophysiology of obesity. **Adv Physiol Educ**, v. 41, n. 4, p. 505-513, Dec 1 2017. ISSN 1522-1229 (Electronic)

1043-4046 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28978518> >.

BRAGA, A. A.; AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. NOC-9, a selective nitric oxide donor, induces flight reactions in the dorsolateral periaqueductal gray of rats by activating soluble guanylate cyclase. **Neurosci Lett**, v. 459, n. 2, p. 79-83, Aug 7 2009. ISSN 1872-7972 (Electronic)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427360> >.

BREDT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radic Res**, v. 31, n. 6, p. 577-96, Dec 1999. ISSN 1071-5762 (Print)

1029-2470 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10630682> >.

CAI, D. Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. **Trends Endocrinol Metab**, v. 24, n. 1, p. 40-7, Jan 2013. ISSN 1879-3061 (Electronic)

1043-2760 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23265946> >.

CAMPFIELD, L. A. et al. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 546-9, Jul 28 1995. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7624778> >.

CAMPOS, A. R. et al. Acute effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. **Phytother Res**, v. 19, n. 5, p. 441-3, May 2005. ISSN 0951-418X (Print)

0951-418X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16106397> >.

CAO, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. **J Endocrinol**, v. 220, n. 2, p. T47-59, Feb 2014. ISSN 1479-6805 (Electronic)

0022-0795 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403378> >.

CARILLON, J. et al. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 254-261, Dec 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792771> >.

CATORCE, M. N.; GEVORKIAN, G. LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. **Curr Neuropharmacol**, v. 14, n. 2, p. 155-64, 2016. ISSN 1875-6190 (Electronic)

1570-159X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26639457> >.

CHAPUT, J. P.; DOUCET, E.; TREMBLAY, A. Obesity: a disease or a biological adaptation? An update. **Obes Rev**, v. 13, n. 8, p. 681-91, Aug 2012. ISSN 1467-789X (Electronic)

1467-7881 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417138> >.

CHARNEY, D. S. Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. **Acta Psychiatr Scand Suppl**, n. 417, p. 38-50, 2003. ISSN 0065-1591 (Print) 0065-1591 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12950435> >.

CHEN, W. et al. Effects of 7-nitroindazole, a selective neural nitric oxide synthase inhibitor, on context-shock associative learning in a two-process contextual fear conditioning paradigm. **Neurobiol Learn Mem**, v. 134 Pt B, p. 287-93, Oct 2016. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27481222> >.

CLEGG, D. J. et al. Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. **Physiol Behav**, v. 103, n. 1, p. 10-6, Apr 18 2011. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21241723> >.

COLEMAN, D. L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. **Diabetologia**, v. 14, n. 3, p. 141-8, Mar 1978. ISSN 0012-186X (Print) 0012-186X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/350680> >.

DA COSTA ESTRELA, D. et al. Predictive behaviors for anxiety and depression in female Wistar rats subjected to cafeteria diet and stress. **Physiol Behav**, v. 151, p. 252-63, Nov 1 2015. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26241160> >.

DANTZER, R. Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa. **Physiol Rev**, v. 98, n. 1, p. 477-504, Jan 1 2018. ISSN 1522-1210 (Electronic) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29351513> >.

DARBRE, P. D. Endocrine Disruptors and Obesity. **Curr Obes Rep**, v. 6, n. 1, p. 18-27, Mar 2017. ISSN 2162-4968 (Electronic) 2162-4968 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28205155> >.

DARLING, J. N. et al. Predicting the effects of a high-energy diet on fatty liver and hippocampal-dependent memory in male rats. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 5, p. 910-7, May 2013. ISSN 1930-739X (Electronic) 1930-7381 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23784893> >.

DE-OLIVEIRA, R. W.; GUIMARAES, F. S. Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 12, p. 1529-32, Dec 1999. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10585635> >.

DEY, A. et al. Glucocorticoid sensitization of microglia in a genetic mouse model of obesity and diabetes. **J Neuroimmunol**, v. 269, n. 1-2, p. 20-27, Apr 15 2014. ISSN 1872-8421 (Electronic) 0165-5728 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24534266> >.

DINEL, A. L. et al. Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24325, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949705> >.

DREXLER, S. M. et al. Effects of Cortisol on Reconsolidation of Reactivated Fear Memories. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 13, p. 3036-43, Dec 2015. ISSN 1740-634X (Electronic) 0893-133X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26058664> >.

DUTHEIL, S. et al. High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 7, p. 1874-87, Jun 2016. ISSN 1740-634X (Electronic) 0893-133X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26658303> >.

ERNST, A. et al. Diabetic db/db mice exhibit central nervous system and peripheral molecular alterations as seen in neurological disorders. **Transl Psychiatry**, v. 3, p. e263, May 28 2013. ISSN 2158-3188 (Electronic) 2158-3188 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23715298> >.

FABRI, D. R. et al. The expression of contextual fear conditioning involves activation of a NMDA receptor-nitric oxide-cGMP pathway in the dorsal hippocampus of rats. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 24, n. 10, p. 1676-86, Oct 2014. ISSN 1873-7862 (Electronic) 0924-977X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25174523> >.

FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. 20 years of leptin: human disorders of leptin action. **J Endocrinol**, v. 223, n. 1, p. T63-70, Oct 2014. ISSN 1479-6805 (Electronic) 0022-0795 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25232148> >.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 5, p. 743-60, May 1999. ISSN 0149-7634 (Print) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392663> >.

FERREIRA, A. et al. Cafeteria-diet effects on cognitive functions, anxiety, fear response and neurogenesis in the juvenile rat. **Neurobiol Learn Mem**, v. 155, p. 197-207, Nov 2018. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30075193> >.

FINLIN, B. S. et al. Mast Cells Promote Seasonal White Adipose Beiging in Humans. **Diabetes**, v. 66, n. 5, p. 1237-1246, May 2017. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28250021> >.

FOGAÇA, M. V. et al. Fine-tuning of defensive behaviors in the dorsal periaqueductal gray by atypical neurotransmitters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 357-365, 2012. ISSN 0100-879X.

FOURRIER, C. et al. Brain tumor necrosis factor-alpha mediates anxiety-like behavior in a mouse model of severe obesity. **Brain Behav Immun**, v. 77, p. 25-36, Mar 2019. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30508579> >.

FUJIMOTO, M. et al. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. **Diabetes**, v. 54, n. 5, p. 1340-8, May 2005. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855318> >.

GAC, L. et al. Behavioral characterization of a model of differential susceptibility to obesity induced by standard and personalized cafeteria diet feeding. **Physiol Behav**, v. 152, n. Pt A, p. 315-22, Dec 1 2015. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26440318> >.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol**, v. 316, n. 2, p. 129-39, Mar 25 2010. ISSN 1872-8057 (Electronic) 0303-7207 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723556> >.

- GARIEPY, G.; NITKA, D.; SCHMITZ, N. The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. **Int J Obes (Lond)**, v. 34, n. 3, p. 407-19, Mar 2010. ISSN 1476-5497 (Electronic) 0307-0565 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997072> >.
- GARIEPY, G. et al. The interaction of obesity and psychological distress on disability. **Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol**, v. 45, n. 5, p. 531-40, May 2010. ISSN 1433-9285 (Electronic) 0933-7954 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19575138> >.
- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends Neurosci**, v. 14, n. 2, p. 60-7, Feb 1991. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1708538> >.
- GHASEMI, A.; JEDDI, S. Anti-obesity and anti-diabetic effects of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 70, p. 9-24, Nov 1 2017. ISSN 1089-8611 (Electronic) 1089-8603 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28804022> >.
- GHASEMI, R. et al. Brain insulin dysregulation: implication for neurological and neuropsychiatric disorders. **Mol Neurobiol**, v. 47, n. 3, p. 1045-65, Jun 2013. ISSN 1559-1182 (Electronic) 0893-7648 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23335160> >.
- GIL-CARDOSO, K. et al. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. **Br J Nutr**, v. 117, n. 2, p. 218-229, Jan 2017. ISSN 1475-2662 (Electronic) 0007-1145 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28132653> >.
- GOMES, J. A. S. et al. A high-refined carbohydrate diet facilitates compulsive-like behavior in mice through the nitric oxide pathway. **Nitric Oxide**, v. 80, p. 61-69, Nov 1 2018. ISSN 1089-8611 (Electronic) 1089-8603 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30125695> >.
- GRUNDY, S. M. et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Circulation**, v. 109, n. 3, p. 433-8, Jan 27 2004. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744958> >.
- GUIMARAES, F. S. et al. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1313-22, 2005. ISSN 0149-7634 (Print) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16095696> >.
- GUIMARAES, F. S. et al. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. **Neuroreport**, v. 5, n. 15, p. 1929-32, Oct 3 1994. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531004> >.
- GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 126-52, Jun 2005. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115721> >.
- GULATI, K.; RAI, N.; RAY, A. Nitric Oxide and Anxiety. **Vitam Horm**, v. 103, p. 169-192, 2017. ISSN 0083-6729 (Print) 0083-6729 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28061970> >.

GUO, M. et al. Selective deletion of leptin receptors in adult hippocampus induces depression-related behaviours. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 4, p. 857-67, May 2013. ISSN 1469-5111 (Electronic) 1461-1457 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22932068> >.

GUO, M.; LU, X. Y. Leptin receptor deficiency confers resistance to behavioral effects of fluoxetine and desipramine via separable substrates. **Transl Psychiatry**, v. 4, p. e486, Dec 2 2014. ISSN 2158-3188 (Electronic) 2158-3188 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25463972> >.

HALL, K. D. A review of the carbohydrate-insulin model of obesity. **Eur J Clin Nutr**, v. 71, n. 3, p. 323-326, Mar 2017. ISSN 1476-5640 (Electronic) 0954-3007 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28074888> >.

HAZLERIGG, D.; SIMONNEAUX, V. Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. In: (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 2015. p.1575-1604. ISBN 9780123971753.

HOOGLAND, I. C. et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. **J Neuroinflammation**, v. 12, p. 114, Jun 6 2015. ISSN 1742-2094 (Electronic) 1742-2094 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26048578> >.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R.; MYSKIW, J. C. Fear Memory. **Physiol Rev**, v. 96, n. 2, p. 695-750, Apr 2016. ISSN 1522-1210 (Electronic) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26983799> >.

JEFFERYS, D.; FUNDER, J. Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 295, n. 2-3, p. 131-5, Jan 11 1996. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720576> >.

JOCA, S. R.; GUIMARAES, F. S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 185, n. 3, p. 298-305, Apr 2006. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16518647> >.

KALANI, A. et al. Dementia-like pathology in type-2 diabetes: A novel microRNA mechanism. **Mol Cell Neurosci**, v. 80, p. 58-65, Apr 2017. ISSN 1095-9327 (Electronic) 1044-7431 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28219659> >.

KERN, P. A. et al. The effects of temperature and seasons on subcutaneous white adipose tissue in humans: evidence for thermogenic gene induction. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 12, p. E2772-9, Dec 2014. ISSN 1945-7197 (Electronic) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25299843> >.

KIM, J. G. et al. Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 7, p. 908-10, Jul 2014. ISSN 1546-1726 (Electronic) 1097-6256 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24880214> >.

KRAUSE, M. A. Evolutionary perspectives on learning: conceptual and methodological issues in the study of adaptive specializations. **Anim Cogn**, v. 18, n. 4, p. 807-20, Jul 2015. ISSN 1435-9456 (Electronic) 1435-9448 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25758787> >.

LACERDA, D. R. et al. Aerobic training reduces immune cell recruitment and cytokine levels in adipose tissue in obese mice. **Appl Physiol Nutr Metab**, Oct 10 2018. ISSN 1715-5320 (Electronic)

1715-5312 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30304638> >.

LEDOUX, J. E. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. **Curr Opin Neurobiol**, v. 2, n. 2, p. 191-7, Apr 1992. ISSN 0959-4388 (Print)

0959-4388 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1638153> >.

_____. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci**, v. 23, p. 155-84, 2000. ISSN 0147-006X (Print)

0147-006X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845062> >.

LEFFA, D. D. et al. Effects of palatable cafeteria diet on cognitive and noncognitive behaviors and brain neurotrophins' levels in mice. **Metab Brain Dis**, v. 30, n. 4, p. 1073-82, Aug 2015. ISSN 1573-7365 (Electronic)

0885-7490 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25998605> >.

LEMOS, T.; GALLAGHER, D. Current body composition measurement techniques. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 24, n. 5, p. 310-314, Oct 2017. ISSN 1752-2978 (Electronic)

1752-296X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28696961> >.

LISBOA, S. F. et al. Increased Contextual Fear Conditioning in iNOS Knockout Mice: Additional Evidence for the Involvement of Nitric Oxide in Stress-Related Disorders and Contribution of the Endocannabinoid System. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 18, n. 8, Jan 24 2015. ISSN 1469-5111 (Electronic)

1461-1457 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25618404> >.

LIU, J.; GUO, M.; LU, X. Y. Leptin/LepRb in the Ventral Tegmental Area Mediates Anxiety-Related Behaviors. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 19, n. 2, Oct 5 2015. ISSN 1469-5111 (Electronic)

1461-1457 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26438799> >.

LIU, W. et al. Leptin receptor knockout-induced depression-like behaviors and attenuated antidepressant effects of exercise are associated with STAT3/SOCS3 signaling. **Brain Behav Immun**, v. 61, p. 297-305, Mar 2017. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28069387> >.

LOPRESTI, A. L.; DRUMMOND, P. D. Obesity and psychiatric disorders: commonalities in dysregulated biological pathways and their implications for treatment. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 45, p. 92-9, Aug 1 2013. ISSN 1878-4216 (Electronic)

0278-5846 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685202> >.

LOWENSTEIN, C. J.; DINERMAN, J. L.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger. **Ann Intern Med**, v. 120, n. 3, p. 227-37, Feb 1 1994. ISSN 0003-4819 (Print)

0003-4819 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8273987> >.

LUO, L.; LIU, M. Adipose tissue in control of metabolism. **J Endocrinol**, v. 231, n. 3, p. R77-R99, Dec 2016. ISSN 1479-6805 (Electronic)

0022-0795 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27935822> >.

MAHER, R. L. et al. Group housing and nest building only slightly ameliorate the cold stress of typical housing in female C57BL/6J mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 308, n. 12, p. R1070-9, Jun 15 2015. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25876655> >.

MAINARDI, M.; FUSCO, S.; GRASSI, C. Modulation of hippocampal neural plasticity by glucose-related signaling. **Neural Plast**, v. 2015, p. 657928, 2015. ISSN 1687-5443 (Electronic)

1687-5443 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25977822> >.

MAKAR, T. K. et al. Lipid metabolism and membrane composition are altered in the brains of type II diabetic mice. **J Neurochem**, v. 64, n. 5, p. 2159-68, May 1995. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7722501> >.

MALDONADO-RUIZ, R.; FUENTES-MERA, L.; CAMACHO, A. Central Modulation of Neuroinflammation by Neuropeptides and Energy-Sensing Hormones during Obesity. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 7949582, 2017. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28913358> >.

MANSUR, R. B.; BRIETZKE, E.; MCINTYRE, R. S. Is there a "metabolic-mood syndrome"? A review of the relationship between obesity and mood disorders. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 52, p. 89-104, May 2015. ISSN 1873-7528 (Electronic)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25579847> >.

MANSUR, R. B. et al. Diabetes mellitus and disturbances in brain connectivity: a bidirectional relationship? **Neuromolecular Med**, v. 16, n. 4, p. 658-68, Dec 2014. ISSN 1559-1174 (Electronic)

1535-1084 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24974228> >.

MAREN, S.; PHAN, K. L.; LIBERZON, I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 6, p. 417-28, Jun 2013. ISSN 1471-0048 (Electronic)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23635870> >.

MILAD, M. R.; QUIRK, G. J. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. **Annu Rev Psychol**, v. 63, p. 129-51, 2012. ISSN 1545-2085 (Electronic) 0066-4308 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22129456> >.

MILAD, M. R.; RADULOVIC, J. Introduction to the special issue of Neurobiology of Learning and Memory on fear extinction. **Neurobiol Learn Mem**, v. 113, p. 1-2, Sep 2014. ISSN 1095-9564 (Electronic)

1074-7427 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24727221> >.

MILAD, M. R. et al. Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. **Biol Psychol**, v. 73, n. 1, p. 61-71, Jul 2006. ISSN 0301-0511 (Print)

0301-0511 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476517> >.

MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J. H.; COPPACK, S. W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 22, n. 12, p. 1145-58, Dec 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9877249> >.

MONCADA, S. Nitric oxide. **J Hypertens Suppl**, v. 12, n. 10, p. S35-9, Dec 1994. ISSN 0952-1178 (Print)

0952-1178 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7539493> >.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, n. 27, p. 2002-12, Dec 30 1993. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504210> >.

MONTEZUMA, K. et al. Inhibition of iNOS induces antidepressant-like effects in mice: pharmacological and genetic evidence. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 485-91, Jan 2012. ISSN 1873-7064 (Electronic) 0028-3908 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21939674> >.

MOREIRA, F. A.; MOLCHANOV, M. L.; GUIMARAES, F. S. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 171, n. 2, p. 199-203, Jan 2004. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12955288> >.

MORLEY, J. E. et al. Measurement of nitric oxide synthase and its mRNA in genetically obese (ob/ob) mice. **Life Sci**, v. 57, n. 14, p. 1327-31, 1995. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7564879> >.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Arch Toxicol**, v. 91, n. 2, p. 549-599, Feb 2017. ISSN 1432-0738 (Electronic) 0340-5761 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27722929> >.

MYERS, K. M.; DAVIS, M. Mechanisms of fear extinction. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 2, p. 120-150, 2006. ISSN 1359-4184 1476-5578.

MYERS, M. G.; COWLEY, M. A.; MUNZBERG, H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. **Annu Rev Physiol**, v. 70, p. 537-56, 2008. ISSN 0066-4278 (Print) 0066-4278 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17937601> >.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 9, p. E396-406, Sep 2013. ISSN 1930-739X (Electronic) 1930-7381 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23696431> >.

OLIVEIRA, M. C. et al. Two opposite extremes of adiposity similarly reduce inflammatory response of antigen-induced acute joint inflammation. **Nutrition**, v. 33, p. 132-140, Jan 2017. ISSN 1873-1244 (Electronic) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27427510> >.

OLIVEROS, E. et al. The concept of normal weight obesity. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 56, n. 4, p. 426-33, Jan-Feb 2014. ISSN 1873-1740 (Electronic) 0033-0620 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24438734> >.

OMS. Organização Mundial de Saúde. 2000/2016/2018.

ORTEGA, F. B.; LAVIE, C. J.; BLAIR, S. N. Obesity and Cardiovascular Disease. **Circ Res**, v. 118, n. 11, p. 1752-70, May 27 2016. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27230640> >.

PARSONS, R. G.; RESSLER, K. J. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 2, p. 146-53, Feb 2013. ISSN 1546-1726 (Electronic) 1097-6256 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23354388> >.

PATI, S. et al. Effects of high-fat diet and age on the blood lipidome and circulating endocannabinoids of female C57BL/6 mice. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**, v.

- 1863, n. 1, p. 26-39, Jan 2018. ISSN 1388-1981 (Print)
1388-1981 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28986283> >.
- PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behav Neurosci**, v. 106, n. 2, p. 274-85, Apr 1992. ISSN 0735-7044 (Print)
0735-7044 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1590953> >.
- PLATT, T. L. et al. Obesity, diabetes, and leptin resistance promote tau pathology in a mouse model of disease. **Neuroscience**, v. 315, p. 162-74, Feb 19 2016. ISSN 1873-7544 (Electronic)
0306-4522 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26701291> >.
- RAMOS-RODRIGUEZ, J. J. et al. Central proliferation and neurogenesis is impaired in type 2 diabetes and prediabetes animal models. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e89229, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586614> >.
- RAO, K. M. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 3, n. 1, p. 27-58, Jan-Mar 2000. ISSN 1093-7404 (Print)
1093-7404 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10711324> >.
- REICHEL, A. C. et al. Dietary-induced obesity disrupts trace fear conditioning and decreases hippocampal reelin expression. **Brain Behav Immun**, v. 43, p. 68-75, Jan 2015. ISSN 1090-2139 (Electronic)
0889-1591 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043993> >.
- REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 11, p. 633-643, Nov 2017. ISSN 1759-5037 (Electronic)
1759-5029 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28799554> >.
- REUS, G. Z. et al. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. **Neuroscience**, v. 300, p. 141-54, Aug 6 2015. ISSN 1873-7544 (Electronic)
0306-4522 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25981208> >.
- RIGANO, K. S. et al. Life in the fat lane: seasonal regulation of insulin sensitivity, food intake, and adipose biology in brown bears. **J Comp Physiol B**, v. 187, n. 4, p. 649-676, May 2017. ISSN 1432-136X (Electronic)
0174-1578 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27987017> >.
- ROMERO-CORRAL, A. et al. Normal weight obesity: a risk factor for cardiometabolic dysregulation and cardiovascular mortality. **Eur Heart J**, v. 31, n. 6, p. 737-46, Mar 2010. ISSN 1522-9645 (Electronic)
0195-668X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19933515> >.
- RUDERMAN, N. et al. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. **Diabetes**, v. 47, n. 5, p. 699-713, May 1998. ISSN 0012-1797 (Print)
0012-1797 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9588440> >.
- RUMMEL, C. Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. **Brain Behav Immun**, v. 54, p. 1-14, May 2016. ISSN 1090-2139 (Electronic)
0889-1591 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26348582> >.
- SALLAM, N. et al. Weight and inflammation are the major determinants of vascular dysfunction

in the aortae of db/db mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 383, n. 5, p. 483-92, May 2011. ISSN 1432-1912 (Electronic) 0028-1298 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21374070> >.

SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **J Clin Invest**, v. 127, n. 1, p. 1-4, Jan 3 2017. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28045402> >.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 6, p. 1109-17, Jun 2011. ISSN 1930-739X (Electronic) 1930-7381 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21331068> >.

SANTOS, C. J. et al. Carbohydrate-enriched diet predispose to anxiety and depression-like behavior after stress in mice. **Nutr Neurosci**, v. 21, n. 1, p. 33-39, Jan 2018. ISSN 1476-8305 (Electronic) 1028-415X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27472404> >.

SASAKI, T. et al. Overexpression of insulin receptor partially improves obese and diabetic phenotypes in db/db mice. **Endocr J**, v. 62, n. 9, p. 787-96, 2015. ISSN 1348-4540 (Electronic) 0918-8959 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26096452> >.

SHAFAT, A.; MURRAY, B.; RUMSEY, D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. **Appetite**, v. 52, n. 1, p. 34-8, Feb 2009. ISSN 1095-8304 (Electronic) 0195-6663 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18680774> >.

SHARMA, A. N. et al. Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. **Physiol Behav**, v. 101, n. 3, p. 381-8, Oct 5 2010. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637218> >.

SOBESKY, J. L. et al. High-fat diet consumption disrupts memory and primes elevations in hippocampal IL-1beta, an effect that can be prevented with dietary reversal or IL-1 receptor antagonism. **Brain Behav Immun**, v. 42, p. 22-32, Nov 2014. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24998196> >.

SONNA, L. A. et al. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **J Appl Physiol (1985)**, v. 92, n. 4, p. 1725-42, Apr 2002. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11896043> >.

SORRELLS, S. F. et al. The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 33-9, Oct 15 2009. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840546> >.

SPIACCI, A., JR. et al. Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 88, n. 3, p. 247-55, Jan 2008. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17915303> >.

TARTAGLIA, L. A. The leptin receptor. **J Biol Chem**, v. 272, n. 10, p. 6093-6, Mar 7 1997. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9102398> >.

TARTAGLIA, L. A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1263-71, Dec 29 1995. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8548812> >.

TEIXEIRA, D. et al. The metabolic and neuroinflammatory changes induced by consuming a cafeteria diet are age-dependent. **Nutr Neurosci**, v. 22, n. 4, p. 284-294, Apr 2019. ISSN 1476-8305 (Electronic) 1028-415X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28958196> >.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 03, p. 329-339, 2007. ISSN 0029-6651 1475-2719.

VIGITEL. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico no Brasil. 2016.

VILA-VERDE, C. et al. Nitric oxide in the prelimbic medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats. **Neuroscience**, v. 320, p. 30-42, Apr 21 2016. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812037> >.

WANG, Q.; ROWAN, M. J.; ANWYL, R. Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. **J Neurosci**, v. 24, n. 27, p. 6049-56, Jul 7 2004. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240796> >.

WANG, T.; EL KEBIR, D.; BLAISE, G. Inhaled nitric oxide in 2003: a review of its mechanisms of action. **Can J Anaesth**, v. 50, n. 8, p. 839-46, Oct 2003. ISSN 0832-610X (Print) 0832-610X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14525827> >.

WASIM, M. et al. Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity. **Biochem Genet**, v. 54, n. 5, p. 565-72, Oct 2016. ISSN 1573-4927 (Electronic) 0006-2928 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27313173> >.

WEGENER, G.; VOLKE, V. Nitric Oxide Synthase Inhibitors as Antidepressants. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 3, n. 1, p. 273-299, Jan 20 2010. ISSN 1424-8247 (Print) 1424-8247 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27713253> >.

WILTINK, J. et al. Associations between depression and different measures of obesity (BMI, WC, WHtR, WHR). **BMC Psychiatry**, v. 13, p. 223, Sep 12 2013. ISSN 1471-244X (Electronic) 1471-244X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24028572> >.

WOODIE, L.; BLYTHE, S. The differential effects of high-fat and high-fructose diets on physiology and behavior in male rats. **Nutr Neurosci**, v. 21, n. 5, p. 328-336, Jun 2018. ISSN 1476-8305 (Electronic) 1028-415X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28195006> >.

WOSISKI-KUHN, M. et al. Glucocorticoid receptor activation impairs hippocampal plasticity by suppressing BDNF expression in obese mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 42, p. 165-77, Apr 2014. ISSN 1873-3360 (Electronic) 0306-4530 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24636513> >.

WU, H. W. et al. A high-fructose diet induces hippocampal insulin resistance and exacerbates memory deficits in male Sprague-Dawley rats. **Nutr Neurosci**, v. 18, n. 7, p. 323-8, Oct 2015. ISSN 1476-8305 (Electronic) 1028-415X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24856097> >.

YAMADA-GOTO, N. et al. Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice. **J Neuroendocrinol**, v. 24, n. 8, p. 1120-5, Aug 2012. ISSN 1365-2826 (Electronic) 0953-8194 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487415> >.

YANG, J. L. et al. The Effects of High-fat-diet Combined with Chronic Unpredictable Mild Stress on Depression-like Behavior and Leptin/LepRb in Male Rats. **Sci Rep**, v. 6, p. 35239, Oct 14 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27739518> >.

YILDIZ AKAR, F. et al. 7-Nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, impairs passive-avoidance and elevated plus-maze memory performance in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 87, n. 4, p. 434-43, Oct 2007. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17602730> >.

YILDIZ, F. et al. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 149, n. 1, p. 41-4, Mar 2000. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10789881> >.

ZEENI, N. et al. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. **Inflamm Res**, v. 64, n. 7, p. 501-12, Jul 2015. ISSN 1420-908X (Electronic) 1023-3830 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25966976> >.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1 1994. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236> >.

ZHAO, Q. et al. Chotosan ameliorates cognitive and emotional deficits in an animal model of type 2 diabetes: possible involvement of cholinergic and VEGF/PDGF mechanisms in the brain. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 188, Oct 20 2012. ISSN 1472-6882 (Electronic) 1472-6882 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23082896> >.

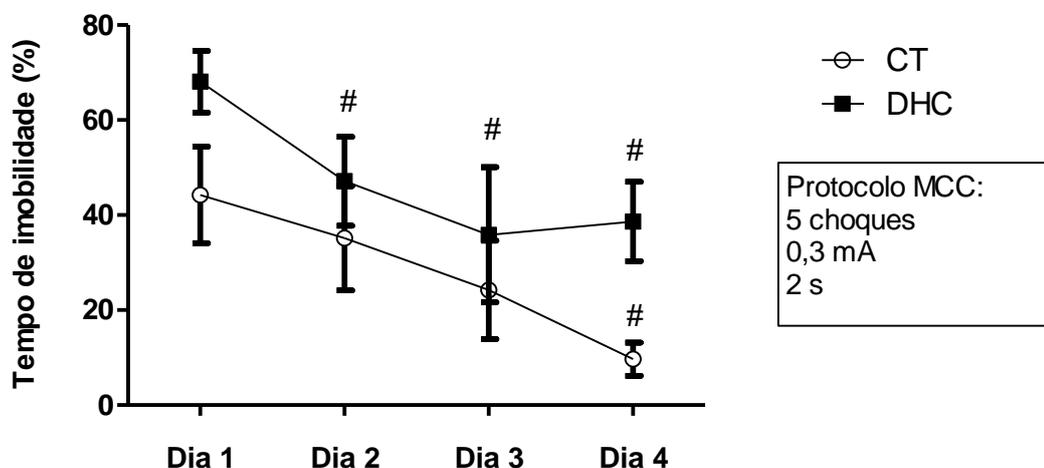
Apêndice

A proposta inicial dessa dissertação de mestrado era testar a hipótese de que animais alimentados com a dieta rica em carboidrato (HC) apresentariam prejuízo da extinção da memória aversiva. E também avaliar se os efeitos seriam dependentes da formação do NO via iNOS. Uma vez que dados prévios do nosso laboratório mostraram aumento na expressão da memória aversiva no teste MCC (Santos *et al.*, 2018), aumento da enzima iNOS e, após administração de AMG 50 mg/kg, houve redução do comportamento tipo compulsivo (Gomes *et al.*, 2018) em animais da dieta HC.

O protocolo desse projeto foi aprovado pelo CEUA sob o número: 296/2016. Foram utilizados camundongos Balb-C machos com idade entre 5-7 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO – UFMG). Os animais do grupo controle receberam ração padrão para roedores (CR1-Nuvilab®). E os animais da dieta rica em carboidrato (HC) receberam a ração na proporção de 45% de leite condensado (Moça®), 10% de açúcar refinado (União®) e 45% da ração padrão em pó pelo período de 12 semanas (Gomes *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018). Todos animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas com disponibilidade de ração e água *ad libitum*. Após o período da dieta os animais foram expostos ao MCC como descrito em Materiais e Métodos, houve pequenas diferenças no protocolo descritas abaixo e ao lado de cada figura.

Os animais receberam 5 ou 3 choques randomizados com intensidade de 0,3mA e duração de 2 segundos cada, em seguida permaneceram mais 2 minutos na caixa. O teste (Dia 1) foi avaliado 24 horas após a sessão de condicionamento. A extinção foi avaliada durante 3 dias consecutivos (Dias 2, 3 e 4) ou durante 3 dias com intervalo de 48h (Dias 3, 5 e 7), como descrito em cada figura abaixo. Inicialmente, observamos que os animais da dieta HC não apresentaram comportamento do tipo ansiogênico quando comparados com os animais que receberam dieta controle (fator Dieta $F_{(1,24)} = 2,78$ $p = 0,13$; fator Dia $F_{(3,24)} = 10,67$ $p = 0,001$, interação Dieta x Dia $F_{(3,24)} = 1,02$ $p = 0,402$, Figura A1). Ambos os grupos extinguiram a memória aversiva (Bonferroni, $p < 0,05$ em relação ao dia 1A).

Figura A1 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais Balb-C controle ou dieta HC

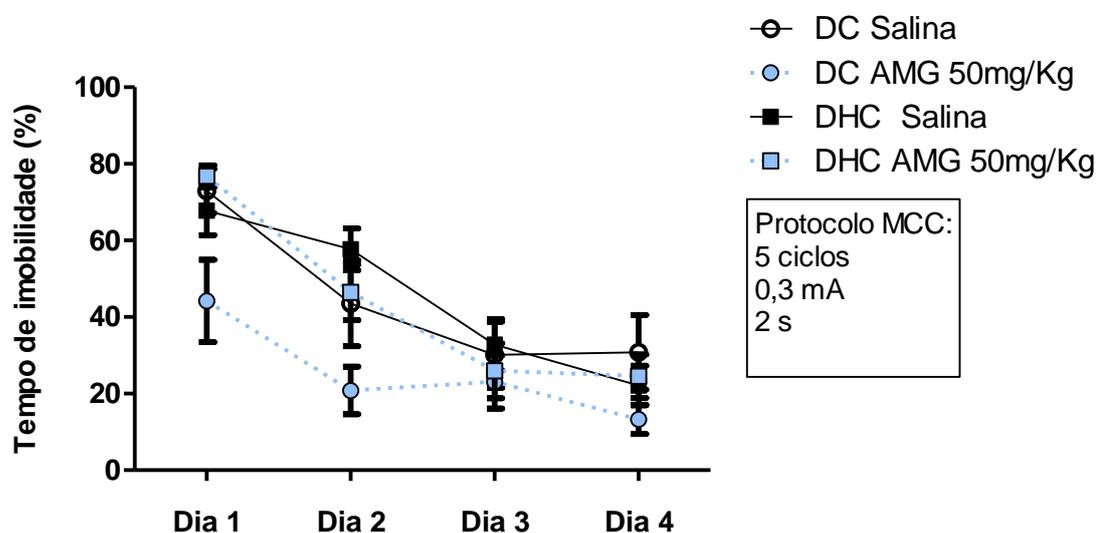


Cada ponto representa média \pm E.P.M da porcentagem do tempo de imobilidade do animal (Two-way ANOVA, seguida do teste de Bonferroni, # $p < 0.05$ em relação ao dia 1) $n = 5$ /grupo.

Considerando que estes dados diferiram dos dados descritos previamente por nosso laboratório (Santos *et al.*, 2018), decidimos avaliar novamente o efeito da dieta HC sobre a expressão e extinção da memória aversiva. Nessa situação, optamos por incluir em nossos grupos experimentais o pré-tratamento com o inibidor preferencial da iNOS, aminoguanidina (50mg/kg), 30 minutos antes do teste.

Novamente os animais que receberam a dieta HC não diferiram dos animais que receberam a dieta controle. O pré-tratamento com a aminoguanidina foi capaz de promover um efeito do tipo ansiolítico nos animais da dieta controle (Figura A2).

Figura A2 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais Balb-C controle ou dieta HC tratados com salina ou AMG 50 mg/kg antes do Teste

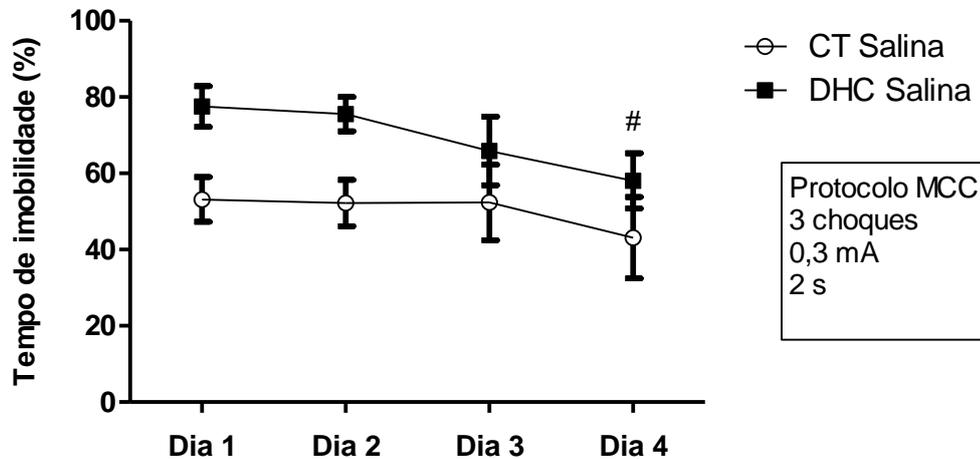


Cada ponto representa média \pm E.P.M da porcentagem do tempo de imobilidade do animal (Two-way ANOVA) n = 6-7 animais/grupo.

Diante desses resultados, observamos que uma possibilidade para a discrepância dos dados seria a alta variabilidade no grupo controle, pois a porcentagem de imobilidade desses animais estava acima de 65%, isso aconteceu nos animais pertencentes ao grupo 2. Assim, optamos por modificar o protocolo experimental do MCC e utilizamos 3 choques na sessão de condicionamento ao invés de 5 choques.

Nesse novo protocolo, observamos que os animais da dieta HC apresentaram maior porcentagem de tempo de imobilidade em relação aos animais da dieta controle [(fator Dieta $F_{(1,13)}= 4,29$ $p= 0,058$, fator Dia $F_{(3,13)}=4,45$ $p= 0,008$, interação Dieta x Dia $F_{(1,13)}= 0,80$ $p=0,51$) Figura A3].

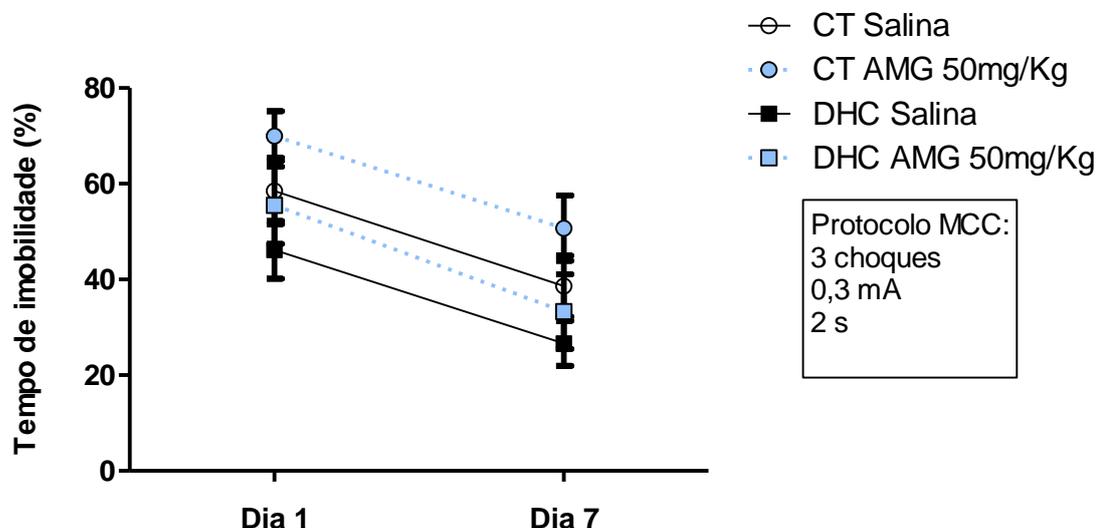
Figura A3 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais Balb-C controle ou dieta HC tratados apenas com salina antes do Teste



Cada ponto representa média \pm E.P.M da porcentagem do tempo de imobilidade do animal (Two-way ANOVA, seguida do teste de Bonferroni, # $p < 0.05$ diferença em relação ao dia 1). $n = 7-8$ animais/grupo.

Considerando os resultados obtidos, optamos por continuar esse novo protocolo do MCC e realizar um novo grupo experimental incluindo o pré-tratamento com aminoguanidina. Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa entre os animais que receberam dieta controle e dieta HC [(fator Tratamento $F_{(3,25)} = 2,18$ $p = 0,043$, fator Dia $F_{(1,25)} = 18,71$ $p < 0,001$, fator Interação $F_{(3,25)} = 0,003$ $p = 0,99$) Figura A4].

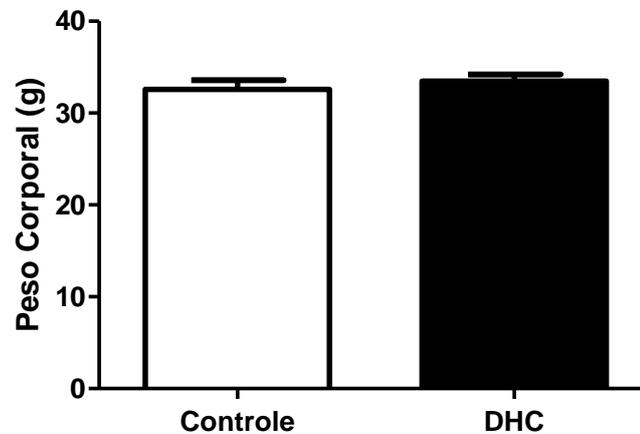
Figura A4 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC de animais Balb-C controle ou dieta HC tratados com salina ou AMG 50 mg/kg antes do Teste



Cada ponto representa média \pm E.P.M da porcentagem do tempo de imobilidade do animal (ANOVA de duas vias seguida de pós teste Bonferroni) n=7 animais/grupo.

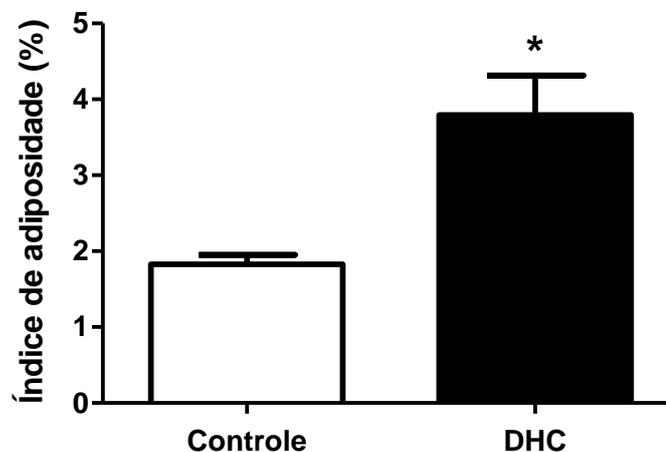
Para avaliação do índice de adiposidade um grupo e animais tratados com dieta HC foi sacrificado e retirado o tecido adiposo TAE, TAM e TAR. Em seguida o tecido foi rapidamente pesado, congelado em gelo seco e armazenado em freezer -80°C para futura análise bioquímica. A dieta HC não foi capaz de promover aumento no peso dos animais [($t_{(13)}= 0,6934$ $p>0,5002$) Figura A5], embora desenvolva a obesidade aumentando o índice de adiposidade nesses animais em relação ao controle [($t_{(13)}=3,918$ $p<0,0018$) Figura A6]

Figura A5 – Peso médio dos animais da dieta controle e dieta HC após 13 semanas de tratamento



Os valores representam a média \pm E.P.M do peso dos animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Análise Teste *t* de *Student*) $n = 7-8$ animais/grupo.

Figura A6 – Índice de adiposidade dos animais da dieta controle e dieta HC após 13 semanas de tratamento



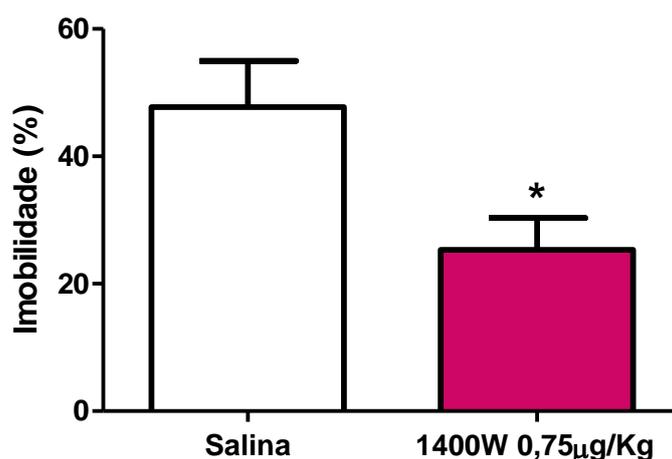
Os valores representam a média \pm E.P.M do índice de adiposidade dos animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Análise Teste *t* de *Student*) $n = 7-8$ animais/grupo.

Considerando a irreprodutibilidade entre os dados da dieta HC, nós optamos em utilizar modelos de obesidade que, além de induzir aumento de adiposidade, induzissem também ganho de peso nos animais, assim o projeto foi desenvolvido empregando a DCaf e animais *db/db*.

Para o desenvolvimento do projeto, todos os parâmetros foram padronizados

previamente, analisamos diferentes intensidades, quantidades e duração do choque, além disto foi avaliado o condicionamento na ausência e na presença do estímulo aversivo (choque), com e sem a manipulação da injeção de salina antes do teste (dados não mostrados), entre outros. Para avaliar a viabilidade da droga 1400W, em animais C57 (WT^(+/?)) adultos, foi aplicado o mesmo protocolo de condicionamento dos animais DCaf e *db/db*, e 30 minutos antes do Teste foi administrado 1400W em uma dose de 0,75 µg/kg, o qual reduziu o comportamento de imobilidade nos animais selvagem [(t₈)=2.548 p<0,0343] Figura A7)]. Para o teste nos animais obesos foi utilizado uma dose sublimiar (1400W 0,5 µg/kg) com o mesmo intuito de avaliar o efeito da droga apenas em animais cuja resposta está exacerbada.

Figura A7 - Porcentagem do tempo de imobilidade no teste do MCC em animais C57 selvagem WT^(+/?) tratados com salina ou 1400W 0,75 µg/kg



As barras representam a média ± E.P.M da porcentagem do tempo de imobilidade do animal (Análise Teste *t* de *Student*) n=5 animais/grupo.