



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**JÚLIA ARIANA DE SOUZA GOMES LENZI**

**CONSUMO CRÔNICO DE DIETA RICA EM CARBOIDRATOS INDUZ ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS VIA ÓXIDO NÍTRICO**

**BELO HORIZONTE  
2017**

**JÚLIA ARIANA DE SOUZA GOMES LENZI**

**CONSUMO CRÔNICO DE DIETA RICA EM CARBOIDRATOS INDUZ ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS VIA ÓXIDO NÍTRICO**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniele Cristina de Aguiar

Co-orientadora: Adaliene Versiani Matos Ferreira

**BELO HORIZONTE  
2017**

**JÚLIA ARIANA DE SOUZA GOMES LENZI**

**CONSUMO CRÔNICO DE DIETA RICA EM CARBOIDRATOS INDUZ ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS VIA ÓXIDO NÍTRICO**

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

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar - Orientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

---

Profa. Dra. Vanessa Beijamini Harres  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Profa. Dra. Janaína Menezes Zanovelli  
Universidade Federal do Paraná (UFP)

---

Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira  
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

---

Profa. Dr. Maristela de Oliveira Poletini  
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

*Dedico este trabalho à minha família e ao meu marido,  
que são minha força e inspiração.*

*“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez”.*

**Jean Cocteau**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos e graças, pela força e inspiração.

À minha professora e orientadora, Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar, a quem devo muito por chegar aonde cheguei e a quem sempre serei especialmente grata! Obrigada por ter sempre me ajudado, apoiado e inspirado a crescer profissionalmente. Agradeço muito por sua confiança, generosidade e por todos os seus conselhos que sempre me ajudaram muito.

À minha co-orientadora, Adaliene Versiani Matos Ferreira, e às suas alunas, Josiane e Marina, pelo apoio na pesquisa e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da UFMG, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por ter concedido a minha bolsa de estudos, pelo apoio financeiro ao projeto (processo 449470/2014-8) e pelo interesse nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fabrício Moreira, pela inspiração de amor à ciência e pelos preciosos conselhos e ensinamentos.

Aos professores das matérias cursadas durante o doutorado, por todos os ensinamentos e por contribuírem para minha formação científica.

Aos professores da banca examinadora, pela disponibilidade de participar da conclusão deste trabalho.

Aos professores Prof. Dr. Antônio Carlos, Profa. Dra. Virgínia Lemos e Profa. Dra. Luciene Vieira, por cederem seus laboratórios, permitirem a realização dos experimentos e orientarem na realização das técnicas. E aos seus alunos, Giovanni, Paula, Grazielle e Carolina, por me ajudarem a desenvolver os experimentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos amigos do LNP, Pedro Gobira e Thércia Viana, pelo acolhimento no início do doutorado e pela amizade.

À Anna Paula, por sua dedicação com o trabalho que foi, sem dúvida, fundamental para a realização desta tese. Agradeço também por sua amizade, carinho e palavras de incentivo.

Aos demais amigos do laboratório, pela ótima convivência e companheirismo! Rita, Jadna, Juliana, Luara, Jivago, Rafaela, Nícia, Filipe, Flávio, João, Rafael, Luciano, Ana Flávia e Dayane... Lembrarei sempre com muito carinho de todos!

Ao Rinaldo, por cuidar com tanto carinho e dedicação dos nossos animais. Sem você, nosso trabalho não seria possível!

Ao Webster, pelo apoio no cuidado aos animais e pela ajuda e disponibilidade sempre que precisei.

Ao Jorge, pela disponibilidade de sempre nos ajudar a solucionar as mais diversas dificuldades.

Aos funcionários da pós-graduação e do Departamento de Farmacologia que sempre se mostraram dispostos a ajudar.

Às minhas amigas, Flávia e Greicy que, mesmo de tão longe, sempre se fizeram tão próximas, alegrando-se com minhas conquistas e apoiando-me nas dificuldades.

Aos meus pais e irmãos, por serem minha fortaleza e alegria, por sempre torcerem e acreditarem em mim.

E ao meu esposo, por seu companheirismo, paciência e carinho e por fazer desta minha conquista a sua também.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	19
1.1 Obesidade e sobrepeso .....	19
1.2 Consumo de alimentos palatáveis .....	20
1.3 Modelos animais de obesidade, tecido adiposo e inflamação.....	21
1.4 Inflamação: possível relação entre obesidade e alterações comportamentais...	23
1.5 Micróglia.....	26
1.6 Óxido Nítrico .....	29
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo Geral .....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Animais .....	35
3.2 Dieta Experimental .....	35
3.3 Delineamento Experimental.....	36
3.4 Consumo Alimentar e Adiposidade.....	36
3.5 Drogas .....	37
3.6 Testes Comportamentais .....	37
3.6.1 Preferência Condicionada ao lugar .....	37
3.6.2 Marble Burying.....	38
3.6.3 Labirinto em Zero Elevado .....	39
3.6.4 Hipofagia Induzida pela Novidade.....	40
3.6.5 Campo aberto .....	41
3.7 Análises Bioquímicas e Histológicas .....	42
3.7.1 Dosagem de Nitrito .....	42
3.7.2 Expressão das proteínas iNOS e nNOS .....	42
3.7.3 Avaliação do número e ativação de células microgliais.....	43
3.7.4 Purificação de sinaptossomas e medição da liberação contínua de glutamato .....	44



3.8 Análises Estatísticas .....	45
4 RESULTADOS .....	47
4.1 Peso corporal, consumo alimentar e adiposidade .....	47
4.2 Avaliações de comportamento e níveis de nitrito.....	49
4.2.1 Teste de Preferência Condicionada ao Lugar .....	49
4.2.2 Teste de Marble Burying .....	50
4.2.3 Modelo de Hipofagia Induzida pela Novidade .....	57
4.2.4 Modelo de Labirinto em Zero Elevado.....	63
4.2.5 Teste de Campo Aberto .....	65
4.4 Expressão de iNOS e nNOS .....	66
4.5 Avaliação do número e da ativação de células microgliais .....	68
4.6 Liberação de glutamato de sinaptossomas estriatais .....	73
5 DISCUSSÃO.....	76
6 CONCLUSÃO .....	89
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Delineamento experimental: consumo crônico de dieta HC. ....	36
<b>Figura 2</b> Delineamento experimental: consumo agudo de dieta HC. ....	36
<b>Figura 3</b> Modelo de condicionamento ao lugar. ....	38
<b>Figura 4</b> Teste de Marble Burying. ....	39
<b>Figura 5</b> Modelo de Labirinto em Zero Elevado. ....	40
<b>Figura 6</b> Modelo de Hipofagia Induzida pela Novidade. ....	41
<b>Figura 7</b> Modelo de campo aberto. ....	41
<b>Figura 8</b> Efeito do consumo crônico de dieta HC na extinção do condicionamento ao lugar induzido por cocaína. ....	49
<b>Figura 9</b> Efeito da aminoguanidina no teste de Marble Burying nas doses de 75 mg/kg (A) e 50 mg/kg (B). ....	51
<b>Figura 10</b> Efeito da aminoguanidina (50 mg/Kg) no teste de Marble Burying em animais alimentados cronicamente com dieta controle ou dieta HC. ....	52
<b>Figura 11</b> Efeito da aminoguanidina (50 mg/Kg) sobre os níveis de nitrito no córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP) de animais alimentados cronicamente com dieta controle ou dieta HC e submetidos ao teste do Marble Burying. ....	53
<b>Figura 12</b> Efeito do n-propil (0,86 µg/Kg) no teste de Marble Burying em animais alimentados cronicamente com dieta controle ou dieta HC. ....	54
<b>Figura 13</b> Efeito do consumo agudo de dieta HC sobre o número de esferas enterradas no teste do Marble Burying. ....	55
<b>Figura 14</b> Níveis de nitrito córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP) de animais alimentados agudamente com dieta controle ou dieta HC e submetidos ao teste do Marble Burying. ....	56
<b>Figura 15</b> Efeito aminoguanidina (50 mg/Kg) sobre a latência do primeiro episódio de alimentação no teste de Hipofagia Induzida pela Novidade em animais que receberam dieta controle ou dieta HC cronicamente. ....	58
<b>Figura 16</b> Consumo alimentar após o teste de Hipofagia Induzida pela Novidade. ....	58
<b>Figura 17</b> Efeito da aminoguanidina (50 mg/Kg) sobre os níveis de nitrito córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP) de animais alimentados com dieta controle ou dieta HC e submetidos ao modelo de Hipofagia Induzida pela novidade. ....	59

<b>Figura 18</b> Correlação entre os níveis de nitrito do córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP) e a latência no teste de Hipofagia Induzida pela Novidade (Correlação de Pearson).....	60
<b>Figura 19</b> Efeito do consumo agudo de dieta HC sobre a latência para o primeiro episódio de comer no modelo de Hipofagia Induzida pela Novidade .....	61
<b>Figura 20</b> Consumo alimentar após o teste de Hipofagia Induzida pela Novidade após consumo agudo de dieta HC.....	61
<b>Figura 21</b> Níveis de nitrito córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP) de animais submetidos ao consumo agudo de dieta controle ou dieta HC e submetidos ao modelo de Hipofagia Induzida pela Novidade .....	62
<b>Figura 22</b> Efeito do consumo crônico de dieta HC sobre o comportamento de animais submetidos ao LZE.....	64
<b>Figura 23</b> Efeito da aminoguanidina (50 mg/Kg) sobre a distância percorrida no teste de campo aberto de animais alimentados cronicamente com dieta controle ou dieta HC .....	65
<b>Figura 24</b> Efeito do consumo agudo de dieta HC sobre a distância percorrida no teste de campo aberto.....	65
<b>Figura 25</b> Efeito do consumo da dieta HC sobre a expressão das proteínas iNOS (A) e nNOS (B) no córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP). .....	67
<b>Figura 26</b> Fotos representativas das bandas do western blotting (CTR=grupo Dieta controle; DHC=dieta HC; CPF=córtex pré-frontal; ST=estriado; HP=hipocampo). .....	67
<b>Figura 27</b> Efeito do consumo crônico de dieta HC sobre os níveis de expressão de células Iba-1 positivas no córtex pré-frontal (A), estriado (B) e hipocampo (C) .....	69
<b>Figura 28</b> Fotos representativas de expressão de células Iba-1 positivas no córtex pré-frontal (A), estriado (B) e hipocampo (C) de animais expostos cronicamente à dieta controle ou dieta HC .....	70
<b>Figura 29</b> Efeito do consumo crônico da dieta HC sobre a ativação de células microgлияis no córtex pré-frontal (A), estriado (B) e hipocampo (B) .....	71
<b>Figura 30</b> Fotos representativas do efeito do consumo da dieta HC sobre a ativação de células microgлияis no córtex pré-frontal (A), estriado (B) e hipocampo (C) .....	72
<b>Figura 31</b> Efeito do consumo crônico de dieta HC sobre a liberação de glutamato em sinaptossomas estriatais.....	74
<b>Figura 32</b> Efeito do consumo agudo de dieta HC sobre a liberação de glutamato em sinaptossomas estriatais.....	74

**Figura 33** Modelo proposto para os efeitos no SNC em decorrência do consumo crônico de dieta HC. .... 89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição Nutricional das dietas controle e rica em carboidratos (HC)...	35
<b>Tabela 2</b> - Efeito do consumo crônico de dieta HC sobre o consumo alimentar diário médio, peso corporal final e adiposidade. ....	47
<b>Tabela 3</b> - Efeito do consumo agudo de dieta HC sobre o consumo alimentar médio, peso corporal e adiposidade. ....	48
<b>Tabela 4</b> - Efeito do consumo crônico de dieta HC sobre a aquisição do condicionamento ao lugar induzido pela cocaína.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

**COX 2** – Cicloxigenase 2

**CPF** – Córtex pré-frontal

**CPP** – Preferência condicionada ao lugar

**eNOS** – Óxido nítrico sintase endotelial

**GMPc** – Monofosfato cíclico de guanosina

**HC** – Rica em carboidrato

**HP** – Hipocampo

**IL-6** – Interleucina – 6

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina - 1 $\beta$

**IMC** – Índice de massa corpórea

**iNOS** – Óxido nítrico sintase induzível

**LPS** – Lipopolisacarídeo bacteriano

**LZE** – Teste de labirinto em zero elevado

**NF- $\kappa$ B** – Fator nuclear  $\kappa$ B

**nNOS** – Óxido nítrico sintase neuronal

**NO** – Óxido Nítrico

**PCR** – Proteína C Reativa

**PKG** – Proteína quinase G

**SNC** – Sistema nervoso central

**ST** – Estriado

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

## RESUMO

O consumo de alimentos industrializados e altamente calóricos cresce a cada ano e, conseqüentemente, o sobrepeso e a obesidade, atingindo taxas alarmantes e tornando-se um dos principais problemas de saúde pública. A inflamação sistêmica de baixo grau é considerada uma característica importante da obesidade e também de várias de suas comorbidades, como diabetes tipo 2, síndrome metabólica, além de transtornos relacionados ao humor. O nível elevado dos mediadores inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias, pode levar ao aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e à subsequente formação de óxido nítrico (NO). No SNC, o NO desempenha um papel fundamental nos comportamentos relacionados à ansiedade, depressão e compulsão. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o consumo crônico ou agudo de dieta rica em carboidratos (HC) modifica comportamentos relacionados à ansiedade e compulsão, e se os efeitos induzidos pelo consumo de dieta HC são decorrentes da exacerbação da síntese de NO. Camundongos Balb/C machos receberam dieta padrão ou HC durante 12 semanas (experimento crônico) ou 3 dias (experimento agudo). A dieta HC era composta de 40% de leite condensado, 40% de dieta padrão, 12% de açúcar refinado e 8% de água. Inicialmente, observamos que o consumo crônico da dieta HC não alterou os efeitos reforçadores promovidos pela cocaína (15 mg/Kg) observados durante a expressão da reposta de condicionamento no Teste de Condicionamento ao Lugar. No entanto, esses animais apresentaram prejuízo na extinção da resposta condicionada em relação aos animais do grupo dieta controle. Posteriormente, observamos que o consumo crônico, mas não agudo, de dieta HC promoveu comportamento tipo-compulsivo, no teste de Marble Burying, e tipo ansiogênico, no teste de Hipofagia Induzida pela Novidade. Observamos que a aminoguanidina (50 mg/Kg), um inibidor preferencial da iNOS, reverteu as alterações comportamentais observadas após o consumo crônico da dieta HC. Esses efeitos foram acompanhados do aumento do NO em estruturas encefálicas relacionadas à regulação de tais comportamentos, como o córtex pré-frontal, estriado e hipocampo (não significativo em relação ao grupo dieta controle no Marble Burying). Tal exacerbação também foi atenuada pelo pré-tratamento com aminoguanidina no núcleo estriado. A exposição aguda à dieta HC não elevou os níveis de nitrito nessas estruturas quando comparado ao grupo dieta controle. Além disso, verificamos, através da técnica de Western Blotting, que o consumo crônico de dieta HC promoveu aumento da enzima iNOS, mas não da sua isoforma neuronal (nNOS) no estriado e córtex pré-frontal, mas não no hipocampo,

além do aumento da ativação ou expressão de células microgliais nessas estruturas encefálicas. Por fim, observou-se o aumento da liberação de glutamato de sinaptossomas estriatais, sendo esse um dos mecanismos pelos quais o NO exerceria seus efeitos sobre o comportamento. Tal efeito não foi observado em animais submetidos ao consumo agudo da dieta HC. Em conjunto, os dados do presente trabalho sugerem que o consumo crônico de dieta HC induz efeito tipo-compulsivo e facilita a susceptibilidade ao estresse em comportamentos de ansiedade. Observa-se ativação das células microgliais que, por sua vez, aumentam a expressão de iNOS, resultando em aumento da produção de NO e subsequente exacerbação da neurotransmissão glutamatérgica. É possível que esse mecanismo esteja envolvido nas alterações comportamentais observadas após o consumo crônico da dieta HC.

**Palavras-chave:** sacarose, ansiedade, estresse, óxido nítrico, micróglia



## ABSTRACT

The consumption of ultra-processed and high-calorie foods increase every year. As consequence, the overweight and obesity reaches alarming rates and becoming a serious public health problem. Low-grade systemic inflammation is considered an important characteristic of obesity and a characteristic of other comorbidities, such as diabetes type 2, metabolic syndrome, as well as mood-related disorders. Inflammatory mediators, including proinflammatory cytokines, upregulate inducible nitric oxide synthase (iNOS), which in turn increases nitric oxide (NO) formation. In the central nervous system, NO play a key role on anxiety, depressive and compulsive related behaviors. Thus, the aim of the present study was evaluate whether the chronic or acute consumption of a high carbohydrate (HC) diet impair anxiety- and compulsive-like behaviors. Moreover, we also verified if the behavioral impairments induced by HC diet consumption are due to the exacerbation of NO synthesis. Male Balb/C mice received standard diet or HCD for 12 weeks (chronic protocol) or 3 days (acute protocol). The HCD was composed of 40% condensed milk, 40% chow diet, 12% refined sugar and 8% water. Initially, we observed that the chronic consumption of the HC diet did not impair the reinforcing effects induced by cocaine injection (15 mg/Kg) in the expression of the conditioning response in the Conditioning Place Preference Test. However, they displayed an impairment in the extinction of the conditioned response when compared to the control diet group. Moreover, the chronic, but not acute, consumption of HC diet induced a compulsive-like behavior in the Marble Burying Test, and anxiogenic-like behavior in the Novelty Suppressed Feeding test, and these effects were inhibited by Aminoguanidine (50 mg/Kg), a preferential inhibitor of iNOS. The behavioral effects observed in Marble Burying Test and Novelty Suppressed Feeding Test were positively correlated with an increase in nitrite levels in brain regions responsible for these behaviors, such as the prefrontal cortex, striatum and hippocampus (not significant in relation to the control diet group in Marble Burying test). Herein, Aminoguanidine also decreased significantly the nitrite levels in the striatum. Acute exposure to HC diet did not increase nitrite levels in these structures compared to the control diet group. In addition, chronic HC diet consumption increased iNOS levels, determined through the Western blotting analysis, in the striatum and prefrontal cortex, but not in the hippocampus as compared to control diet group. No difference between groups was observed to neuronal isoform (nNOS). Further, we also observed an increase in the activation or expression of microglial cells in these brain regions. Finally, glutamate release from striatal synaptosomes was higher in animals

chronically fed with HC diet as compared to control diet group independently of calcium. These effects were not observed in animals acutely fed with HC diet. In conclusion, we suggest that chronic HC diet consumption induces compulsive-like behavior and increases stress vulnerability inducing anxiety-like behavior. It is possible suggest that the mechanisms underlying such effects resulted from activation of the microglial cells, which in turn increase the expression of iNOS, resulting in exacerbation of NO. As consequence, the NO facilitates the glutamatergic neurotransmission inducing the behavioral impairments.

**Key words:** sucrose, anxiety, stress, nitric oxide, microglia

---

*Introdução*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade e sobrepeso

Ao longo das últimas décadas, a prevalência da obesidade e sobrepeso tem crescido em todo o mundo, atingindo taxas alarmantes e tornando-se um dos principais problemas de saúde pública em vários países (Ng *et al.*, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2016), a obesidade mais que dobrou desde 1980 e, em 2014, estimava-se que 39% da população mundial adulta estava acima do peso e 13% eram clinicamente obesos. No Brasil, os números são ainda maiores, pois 52,3% da população brasileira adulta estava acima do peso e que 17% era obesa em 2015 (Vigitel, 2017).

A obesidade é uma doença metabólica, caracterizada pelo aumento de tecido adiposo, além da presença de alterações metabólicas, resistência insulínica e disfunção autonômica (Beske *et al.*, 2002; Fantuzzi, 2005). A obesidade é classificada com base no índice de massa corpórea (IMC), um índice simples que relaciona peso e altura. Estabelece-se que indivíduos com sobrepeso apresentam IMC entre 25 e 29,9 kg/m<sup>2</sup> e, em pessoas obesas, o IMC é maior ou igual a 30 kg/m<sup>2</sup> (OMS, 2016)

O ganho de peso envolve diversos fatores, consistindo em um fenômeno sujeito a uma série de influências individuais e ambientais (Simon *et al.*, 2006; Queiroz *et al.*, 2015) e, apesar do crescimento epidêmico da obesidade e sobrepeso ser complexo, o aumento de peso nas últimas décadas é atribuído às mudanças ambientais e de comportamento da população (Scheers *et al.*, 2012). Dentre os fatores que contribuem para o expressivo aumento da obesidade na sociedade moderna, acredita-se que o aumento do consumo de alimentos industrializados e altamente calóricos seja uma das principais causas (Kilpi *et al.*, 2014). Tais alimentos caracterizam-se por alta densidade calórica, além de baixo poder sacietógeno e elevado efeito hedônico, favorecendo, assim, o aumento da ingestão alimentar e contribuindo para o desequilíbrio energético (Drewnowski e Specter, 2004).

Associado ao aumento do consumo de alimentos altamente calóricos, o estilo de vida moderno também favorece o ganho de peso à medida em que se observa alteração nos padrões de atividade física diária da população (Scheers *et al.*, 2012; Kilpi *et al.*, 2014). Observam-se reduções marcantes no gasto energético dos indivíduos, com aumento do comportamento sedentário durante as últimas décadas (Owen *et al.*, 2010; Scheers *et al.*, 2012).

Os dados sobre o aumento da taxa de obesidade e sobrepeso tornam-se alarmantes, pois constituem fatores de risco para o desenvolvimento de doenças como o diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, alguns tipos de cânceres e síndrome metabólica (Arnold *et al.*, 2016; Bhupathiraju e Hu, 2016; Ortega *et al.*, 2016), além de transtornos psiquiátricos, particularmente a depressão e a ansiedade (Konttinen *et al.*, 2014; Pereira-Miranda *et al.*, 2017). Observa-se que o aumento de peso está relacionado à incapacidade funcional, redução da qualidade de vida e aumento da mortalidade (Kolotkin *et al.*, 2001; Zoico *et al.*, 2004; Flegal *et al.*, 2005).

## 1.2 Consumo de alimentos palatáveis

Nas sociedades com hábitos alimentares ocidentais, observa-se aumento do consumo de sacarose *per capita*, popularmente conhecida como açúcar, e observa-se que o consumo de açúcar excede as diretrizes energéticas mais do que qualquer outro nutriente (Gross *et al.*, 2004; Cordain *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2015). O excesso de sacarose prejudica a sinalização e ativação de regiões cerebrais que regulam a resposta homeostática relacionada à saciedade, contribuindo para o aumento da ingestão e, conseqüentemente, ganho de peso corporal (Moran e Mchugh, 1981; Page *et al.*, 2013). Baseado em tais evidências, vários trabalhos associam o aumento da obesidade ao aumento do consumo de sacarose (Olsen e Heitmann, 2009) e relacionam, ainda, a maior susceptibilidade a doenças cardiovasculares (Dinicolantonio e Lucan, 2014), além de diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (Malik *et al.*, 2010; Sturt, 2011).

As preferências pelos alimentos contendo sacarose e lipídios são adquiridas muito precocemente na vida e o desejo humano pelo sabor doce abrange todas as idades, raças e culturas (Johnson *et al.*, 1991; Liem e De Graaf, 2004; Drewnowski *et al.*, 2012). Em humanos, os dados sugerem que os alimentos mais prováveis de desejo são aqueles que contêm elevado teor de lipídios, sacarose ou ambos (Yanovski, 2003). É interessante destacar que, evolutivamente, as preferências humanas por alimentos doces pode ter representado uma vantagem na sobrevivência, uma vez que ajudava a orientar o comportamento alimentar em relação aos alimentos que fornecem tanto energia quanto nutrientes essenciais (Drewnowski *et al.*, 2012).

Estudos utilizando roedores mostram que alimentos palatáveis, ricos nesses nutrientes, apresentam efeito hedônico e ativam o sistema neurobiológico da recompensa (Hajnal *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2006; Avena *et al.*, 2008). A via mesolímbica, a qual foi identificada como componente chave da recompensa, origina-se em corpos celulares na área tegmental ventral, e os axônios possuem projeções

estriatais para o núcleo accumbens e corticais (Gardner e Ashby, 2000). A ativação desse sistema é determinante para o efeito reforçador de inúmeras classes de drogas de abuso (Adinoff, 2004). Além disso, evidências sugerem que este mesmo circuito também desempenha um papel importante nas recompensas naturais, incluindo os alimentos (Martel e Fantino, 1996; Volkow *et al.*, 2011). Nesse sentido, observa-se que o consumo de dietas palatáveis induz aumento na taxa de disparos dos neurônios dopaminérgicos, e subsequente liberação de dopamina no núcleo accumbens (Hajnal *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2006; Norgren *et al.*, 2006).

Além da via mesolímbica, os alimentos palatáveis interferem na atividade de outras regiões encefálicas (Souza *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012; Sharma e Fulton, 2013; Krishna *et al.*, 2015). Especificamente para a sacarose, a amígdala central apresentou maior ativação, evidenciado pelo maior número de células c-Fos positivas após consumo agudo desse nutriente (Li *et al.*, 2012). Além disso, outras estruturas límbicas, como córtex pré-frontal, podem ter sua função alterada pelo consumo crônico de dieta rica em sacarose (Souza *et al.*, 2007). Entretanto, o efeito prolongado da exposição à essa dieta sobre outras estruturas encefálicas ainda é pouco explorado, sendo relevante estudos que avaliem tal aspecto.

### **1.3 Modelos animais de obesidade, tecido adiposo e inflamação**

Vários modelos experimentais de obesidade são utilizados como ferramentas para a compreensão da fisiopatologia da obesidade. Os modelos animais de obesidade incluem, principalmente, modelos genéticos e induzidos por dieta, sendo que a exposição a dietas ricas em lipídios e/ou sacarose assemelha-se melhor ao estado de obesidade em seres humanos (Lutz e Woods, 2012).

Animais alimentados cronicamente com alimentos com elevado teor de lipídios ou carboidratos, duas importantes fontes de calorias, desenvolvem aumento da adiposidade, evidenciado pelo aumento de deposição de tecido adiposo branco, além de distúrbios metabólicos associados a essa condição (Lumeng *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2013). Dessa forma, dietas ricas nesses nutrientes são amplamente utilizadas em ensaios experimentais de obesidade ou sobrepeso, pois promovem, além da expansão de tecido adiposo, um processo inflamatório sistêmico crônico e de baixo grau, compatível com tais condições em humanos (Lumeng *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2013). De fato, em humanos observa-se uma correlação positiva entre marcadores pró-inflamatórios, como interleucina-6 (IL-6) e proteína C reativa (PCR) e o índice de massa corpórea, sendo que esse aumento não está necessariamente relacionado à obesidade *per se* (Luft *et al.*, 2013).

Os modelos animais de obesidade induzidos por consumo crônico de dieta rica em lipídios ou pelo consumo de alimentos palatáveis, ricos em lipídios e carboidratos, como a dieta de cafeteria, induzem aumento de adiposidade associado ao aumento de peso corporal (Sampey *et al.*, 2011). Entretanto, o modelo de consumo de dieta rica em carboidratos, diferentemente, não promove alteração do peso corporal, por ser isocalórica em relação à dieta controle, porém, observa-se a indução de uma rápida e sustentada expansão do tecido adiposo (Oliveira *et al.*, 2013). O aumento da adiposidade nesses modelos está associado à disfunção metabólica, evidenciada por hiperglicemia, hiperlipidemia, intolerância à glicose, resistência à insulina e alterações nos níveis circulantes de adipocinas (Lin *et al.*, 2000; Sampey *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013). Além disso, no modelo de consumo crônico de dieta rica em carboidrato, demonstrou-se a ocorrência de um processo inflamatório de forma rápida, após um dia de exposição à dieta, e que se mantém após consumo crônico (Oliveira *et al.*, 2013). A resposta inflamatória que emerge nesse modelo é demonstrada pelo aumento de citocinas em tecidos como o fígado, tecido adiposo e intestino (Hyodo *et al.*, 1989; Ferreira *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013; De Oliveira *et al.*, 2015).

O papel tradicional atribuído ao tecido adiposo branco é o armazenamento de energia, liberando ácidos graxos, quando necessário (Trayhurn e Beattie, 2001). Entretanto, o papel fisiológico desse tecido é complexo, envolvendo, por exemplo, isolamento térmico e proteção mecânica (Trayhurn e Beattie, 2001). Além disso, esse tecido possui papel endócrino reconhecido por sua função de sintetizar e liberar adipocinas, como a leptina, e citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$  (Aguilar-Valles *et al.*, 2015). Assim, sugere-se que o tecido adiposo pode ser a fonte primária dos mediadores pró-inflamatórios e a ligação entre inflamação e a disfunção metabólica observada nos modelos animais de obesidade e em humanos (Bourlier e Bouloumie, 2009; Luft *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2013). De fato, há evidências de que o aumento da síntese de mediadores inflamatórios a partir do tecido adiposo é fator que contribui para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos, incluindo dislipidemia, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Wang *et al.*, 2012; Habib *et al.*, 2017), além de sintomas de ansiedade e depressão (Wiltink *et al.*, 2013; Hiles *et al.*, 2016) e alterações comportamentais em roedores (Dutheil *et al.*, 2016).

Assim, as evidências atuais apoiam que a inflamação pode ser um fator importante na relação bidirecional entre a obesidade e os transtornos de humor. Esta sugestão baseia-se na observação de que a inflamação crônica de baixo grau está implicada na fisiopatologia tanto dos transtornos mentais quanto da obesidade independentemente (Gondim *et al.*, 2015; Reus, Fries, *et al.*, 2015). É interessante destacar que, apesar das patologias que afetam o SNC apresentarem diferentes

etiologias e bases fisiopatológicas, elas compartilham o um componente neuroinflamatório comum (Raz *et al.*, 2016).

#### **1.4 Inflamação: possível relação entre obesidade e alterações comportamentais**

Dentre as principais consequências secundárias à obesidade, os transtornos mentais recebem destaque, visto que a associação entre essas condições são constantemente observadas. No início do século XX, acreditava-se amplamente que a obesidade estava intimamente associada com certos distúrbios psiquiátricos. Porém, essa observação partia apenas de relatos de casos de pacientes em psicoterapia, não havendo, até então, estudos consistentes e com rigor metodológico (Moore *et al.*, 1962). Assim, Moore *et al.* (1962) apresentaram dados epidemiológicos confirmando, pela primeira vez, essa forte associação.

Os dados recentes mostram um aumento concomitante da obesidade e sobrepeso e da incidência de patologias do sistema nervoso central (SNC), tais como demência, acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, além dos distúrbios psiquiátricos, principalmente depressão e ansiedade (Guillemot-Legrís e Muccioli, 2017; Pereira-Miranda *et al.*, 2017). Sugere-se que os pacientes obesos representam a população mais propensa a desenvolver tais distúrbios (Bruce-Keller *et al.*, 2009). Ainda, a incidência de obesidade é maior entre os pacientes com transtornos psiquiátricos, incluindo depressão, ansiedade, transtorno bipolar e esquizofrenia em relação à população em geral (Fiedorowicz *et al.*, 2008; Lopresti e Drummond, 2013).

De fato, a obesidade está associada a um aumento de aproximadamente 25% nas probabilidades de transtornos de humor e ansiedade (Simon *et al.*, 2006). Nesse amplo estudo epidemiológico, verificou-se maior risco de ocorrência de transtornos de ansiedade em homens obesos, incluindo transtorno de pânico e transtorno de ansiedade generalizada (Simon *et al.*, 2006). Além disso, Cilli *et al.* (2003) observaram que os sintomas de ansiedade mostraram associação positiva com a obesidade e sugeriram que a obesidade é uma condição clínica que predispõe ao desenvolvimento de distúrbios afetivos clinicamente relevantes (Cilli *et al.*, 2003). Outro estudo mostrou associações entre obesidade e transtornos de ansiedade em mulheres, porém, embora estatisticamente significativos, os autores apontam para uma modesta relação que ocorre principalmente na obesidade severa (Scott *et al.*, 2008).

Em modelos animais, propõe-se que as dietas palatáveis levam a diversos efeitos sobre o comportamento (Dutheil *et al.*, 2016; Vinuesa *et al.*, 2016). Há evidências de que o consumo de dietas palatáveis resulta em alterações nas respostas a psicoestimulantes, mostrando uma menor resposta aos efeitos



reforçadores da cocaína no modelo de condicionamento ao lugar após o consumo crônico de dieta hiperlipídica (Thanos *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2012). Por outro lado, a exposição intermitente a dietas ricas em lipídios ou sacarose induzem comportamento de compulsão alimentar e consequente aumento da atividade locomotora em resposta a psicoestimulantes (Avena e Hoebel, 2003; Yasoshima e Shimura, 2015; Blanco-Gandia *et al.*, 2017). Além disso, no teste de Marble Burying, animais alimentados cronicamente com dieta hiperlipídica apresentaram aumento do comportamento de enterrar esferas, sugerindo comportamento relacionado à compulsão nesse modelo (Krishna *et al.*, 2015; White *et al.*, 2016).

Após consumo crônico de dieta hiperlipídica observa-se, ainda, que os animais apresentam resposta exagerada ao estresse de injeção intraperitoneal de solução salina, além de liberação aumentada de corticosterona (Legendre e Harris, 2006). Além disso, demonstrou-se, que a dieta hiperlipídica induz comportamentos agressivos em ratos e camundongos machos (Hilakivi-Clarke *et al.*, 1996; Buchenauer *et al.*, 2009), mesmo que a dieta seja isocalórica (Hilakivi-Clarke *et al.*, 1996). Adicionalmente, após exposição crônica à dieta rica em lipídios, os animais exibem nível mais elevado de ansiedade, observado em fêmeas expostas ao teste de transição claro-escuro (Sivanathan *et al.*, 2015) e em machos submetidos ao teste de labirinto em zero elevado (Almeida-Suhett *et al.*, 2017).

Há poucos dados na literatura acerca do efeito de alimentos ricos em sacarose sobre comportamentos relacionados ao humor, denotando a importância de estudos que explorem tal relação. Dentre os trabalhos da literatura, Souza *et al.* (2007) verificaram que, de forma semelhante às dietas hiperlipídicas, o consumo crônico de uma dieta enriquecida com sacarose leva ao aumento da ansiedade em roedores, associado ao estresse oxidativo no córtex pré-frontal (Souza *et al.*, 2007).

Além disso, recentemente, em um trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa, observou-se que o consumo crônico de dieta rica em carboidrato altera o comportamento de roedores quando esses são expostos a situações de estresse, evidenciando um efeito de maior susceptibilidade ao estresse nesses animais (Santos *et al.*, 2016). Entretanto, o mecanismo envolvido nesse efeito da dieta rica em carboidrato sobre o comportamento e, além disso, se essa dieta altera outros tipos de comportamento, como aqueles relacionados à compulsão, ainda permanecem por serem elucidados.

Propõem-se que na obesidade a inflamação seja o provável mediador das alterações de comportamento em roedores, e dos distúrbios psiquiátricos em seres humanos. Em modelos animais de obesidade, observa-se que o consumo crônico de dietas palatáveis leva ao aumento de mediadores inflamatórios no SNC, onde o

consumo de dieta hiperlipídica promove ruptura da função vascular cerebral (Lynch *et al.*, 2013), além de aumento da expressão de fatores de transcrição e enzimas envolvidos no processo inflamatório, como fator nuclear  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B) e cicloxigenase 2 (COX2) (Zhang *et al.*, 2005), além do aumento de citocinas pró-inflamatórias (Dutheil *et al.*, 2016; Almeida-Suhett *et al.*, 2017). Há evidências, ainda, de que uma dieta padrão suplementada com sacarose na água dos animais é capaz de induzir a ativação da via ativada pelo NF- $\kappa$ B e subsequente expressão de mediadores pró-inflamatórios no hipocampo após apenas 8 dias (Beilharz *et al.*, 2016). Porém, não há dados na literatura mostrando se o consumo crônico de uma dieta rica em sacarose induz alterações neuroinflamatórias.

Interessantemente, Almeida-Suhett *et al.* (2017) mostraram que o comportamento ansiogênico induzido pelo consumo de dieta hiperlipídica correlaciona-se positivamente com os níveis de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) na amígdala (Almeida-Suhett *et al.*, 2017). Além disso, animais submetidos cronicamente à dieta hiperlipídica apresentam maior susceptibilidade aos efeitos comportamentais da administração do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), uma potente endotoxina bacteriana que promove a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Andre *et al.*, 2014).

Além da obesidade, propõe-se que os transtornos psiquiátricos, incluindo a depressão e transtornos de ansiedade, são condições inflamatórias crônicas de baixo grau caracterizadas por aumento dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , e PCR (Fluitman *et al.*, 2010; Pace e Heim, 2011; Vogelzangs *et al.*, 2013; Haapakoski *et al.*, 2015; Passos *et al.*, 2015; Eyre *et al.*, 2016). Essa hipótese é sustentada pelo fato de que doenças associadas a inflamações crônicas ou alterações imunológicas, incluindo obesidade, diabetes, artrite reumatóide e lúpus apresentam-se como fatores de risco importantes para transtornos psiquiátricos, como depressão, transtorno afetivo bipolar e ansiedade (Nery *et al.*, 2008; Najjar *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013). Adicionalmente, a administração crônica de citocinas, como o interferon- $\alpha$ , para o tratamento de cânceres resistentes à radioterapia e quimioterapia ou para o tratamento de infecções virais crônicas, como a hepatite C, resultam em sintomas depressivos em até 50% dos pacientes (Dantzer e Kelley, 2007). Dessa forma, a regulação neuroimune parece desempenhar um importante papel em muitos aspectos da saúde mental humana (Sominsky *et al.*, 2015).

Em roedores, a administração de LPS causa alterações no comportamento, resultando em redução do consumo alimentar, anedonia, redução do comportamento social e comportamentos relacionados à depressão (Abraham e Johnson, 2009; Tomaz *et al.*, 2014; Le Thuc e Rovere, 2016). Indica-se que a administração sistêmica de LPS induz o aumento da expressão de mediadores inflamatórios no cérebro,

incluindo IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Breder *et al.*, 1994; Ventorp *et al.*, 2017), duas principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas no comportamento de “sickness behavior” (Dantzer *et al.*, 2008). Adicionalmente, experimentos farmacológicos demonstraram que a administração sistêmica de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  altera o comportamento de maneira dose-dependente (Dantzer, 2001).

Mais recentemente, mostrou-se que as respostas de ansiedade induzidas pelo estresse também são mediadas pela inflamação (Wohleb *et al.*, 2014). Sabe-se que a exposição ao estresse resulta em alteração na produção de citocinas, criando um perfil pró-inflamatório (Salim *et al.*, 2012; Patki *et al.*, 2013). As respostas neuroendócrinas e simpáticas ao estresse promovem o tráfico de monócitos para o cérebro e exacerbação do processo de ativação microglial, contribuindo para os efeitos comportamentais do estresse (Wohleb *et al.*, 2014).

Várias são as vias pelas quais as citocinas podem influenciar o comportamento, incluindo efeitos sobre a neurotransmissão, atividade neuroendócrina, plasticidade neural e alterações dos circuitos cerebrais (Capuron e Miller, 2011). A desregulação imune está associada a alterações na neurotransmissão cerebral, evidenciado pela redução da sinalização serotoninérgica e dopaminérgica e aumento da neurotransmissão glutamatérgica (Kitagami *et al.*, 2003; Frenois *et al.*, 2007). Além disso, observa-se hiperativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, com alterações nos níveis séricos de corticosterona (Gadek-Michalska *et al.*, 2013) e redução da neurogênese (Kuzumaki *et al.*, 2010).

A etiologia específica para o processo inflamatório nos transtornos psiquiátricos ainda permanece elusiva, porém várias hipóteses são aventadas para explicar tal ocorrência. Dentre elas, recentemente, é proposto que o aumento de mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e PCR em pacientes com depressão está relacionado, pelo menos em parte, com a obesidade, e não com a depressão *per se* (Shelton *et al.*, 2015). Além disso, corroborando esses dados, observou-se níveis aumentados de diversos mediadores inflamatórios, como IL-5, IL-12, IL-13, e TNF- $\alpha$ , em participantes obesos deprimidos quando comparado com indivíduos também deprimidos, porém, não obesos (Schmidt *et al.*, 2014).

## **1.5 Micróglia**

A micróglia representa um componente essencial da resposta imune inata cerebral (Kalkman e Feuerbach, 2016). Em condições fisiológicas, essas células são importantes para o reconhecimento do patógeno, além de remoção de neurônios apoptóticos, remodelamento sináptico e regulação dos níveis de neurotransmissores

(Tremblay *et al.*, 2011; Boche *et al.*, 2013). Entretanto, o processo de ativação microglial está envolvido na fisiopatologia de distúrbios neurológicos, psiquiátricos e também da obesidade (Haarman *et al.*, 2014; Bocarsly *et al.*, 2015; Brites e Fernandes, 2015; Chiarini *et al.*, 2016).

Iba-1 é uma proteína ligadora de cálcio específica da micróglia, não expressa por neurônios e outras células gliais, e é essencial para o processo de ativação microglial (Imai e Kohsaka, 2002). As células microgliais, quando ativadas por sinalizadores inflamatórios, liberam uma série de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (NO), resultando no processo de neuroinflamação (Barger *et al.*, 2007; Chesnokova *et al.*, 2016).

A neuroinflamação é considerada como um processo onde há ativação de células gliais, não resultando, necessariamente, no recrutamento de células imunes periféricas (Guillemot-Legris e Muccioli, 2017). Nos transtornos psiquiátricos, acredita-se que o processo inflamatório crônico e o estresse oxidativo promovam ativação de células microgliais (Reus, Fries, *et al.*, 2015). Estudos *postmortem* evidenciam o aumento da ativação microglial em pacientes com transtornos psiquiátricos, incluindo esquizofrenia (Radewicz *et al.*, 2000) e depressão (Torres-Platas *et al.*, 2014), além de maior densidade microglial nesses transtornos (Steiner *et al.*, 2008). Diversas condições neurológicas também são marcadas pelo processo de ativação dessas células, como doença de Parkinson, Alzheimer e Esclerose lateral amiotrófica (McGeer *et al.*, 1988; Egensperger *et al.*, 1998; Weydt e Moller, 2005).

Em roedores, submetidos a diferentes situações de estresse, observa-se ativação microglial no córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo, resultando em prejuízo da plasticidade sináptica nessas regiões (Lisboa *et al.*, 2016). As respostas comportamentais ao estresse crônico são decorrentes das alterações na fisiologia microglial que contribuem para respostas neurobiológicas mal adaptativas subjacentes às alterações comportamentais induzidas pelo estresse (Hinwood *et al.*, 2012; Kreisel *et al.*, 2014). Nesse contexto, a integração da sinalização induzida pelo estresse é facilitada no encéfalo pela micróglia, que modula as respostas neurais e endócrinas ao estresse, promovendo as alterações comportamentais relacionadas (Wohleb *et al.*, 2014). Há evidências de que a ativação microglial em modelos animais de estresse resulta em ativação do eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal através da liberação de IL-1 $\beta$  no hipotálamo, reforçando o comportamento relacionado ao estresse (Goshen e Yirmiya, 2009). O processo de ativação microglial pode resultar, ainda, na excitotoxicidade glutamatérgica, uma vez que reduz a expressão dos transportadores

de glutamato nos astrócitos, causando um aumento extracelular desse neurotransmissor (Takaki *et al.*, 2012).

As pesquisas têm sido direcionadas, nos últimos anos, para a avaliação da inibição microglial sobre o comportamento. O tratamento com minociclina, um antibiótico com efeito de reduzir os comportamentos relacionados à depressão em roedores, é capaz de inibir a ativação microglial e reduzir citocinas pró-inflamatórias, a ativação da indoleamina-2,3-dioxigenase e o estresse oxidativo (Shen *et al.*, 1999; Henry *et al.*, 2008; Reus, Abelaira, *et al.*, 2015). Em modelos de estresse, o prejuízo cognitivo e o efeito ansiogênico do estresse podem ser revertidos pelo tratamento com minociclina (Hinwood *et al.*, 2012; Levkovitz *et al.*, 2015), assim como os comportamentos positivos e negativos e déficits cognitivos relacionados à esquizofrenia (Monte *et al.*, 2013).

O interesse em avaliar como as células gliais poderiam participar da fisiopatologia da obesidade foi iniciado pelos estudos que mostraram a indução de processo inflamatório no hipotálamo em resposta à dieta hiperlipídica e ativação microglial nessa estrutura (Thaler *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2014; Chowen *et al.*, 2016). Observou-se que, na obesidade, as células microgliais apresentam um estado pró-inflamatório no núcleo arqueado do hipotálamo, um importante núcleo hipotalâmico que regula a homeostase energética (Thaler *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2014) e que, tanto em humanos quanto em roedores, a obesidade está associada à injúria neuronal nessa estrutura envolvida no controle do peso corporal (Thaler *et al.*, 2012). Interessantemente, o tratamento com drogas que promovem redução da ativação microglial no núcleo arqueado do hipotálamo resulta em menor ingestão alimentar, redução do ganho de peso corporal e da adiposidade de animais expostos cronicamente à dieta hiperlipídica (Gao *et al.*, 2014; Andre *et al.*, 2017).

Além disso, dados mais recentes mostraram que o consumo crônico de dieta hiperlipídica leva à ativação dessas células não só no hipotálamo, mas também em estruturas límbicas, tais como hipocampo e córtex pré-frontal, podendo ser um dos fatores mediadores das alterações comportamentais observadas nesses animais (Bocarsly *et al.*, 2015; Vinuesa *et al.*, 2016).

Baseado em tais evidências, observa-se o importante papel das células microgliais na fisiopatologia tanto da obesidade, quanto dos transtornos psiquiátricos e do efeito da dieta hiperlipídica em mediar o processo de ativação dessas células. Entretanto, não há dados mostrando se o consumo de dieta rica em carboidratos altera também o perfil de ativação dessas células, denotando a relevância de estudos dirigidos para esse objetivo.

## 1.6 Óxido Nítrico

O NO é um composto gasoso produzido a partir da conversão de L-arginina a L-citrulina. Sua produção é regulada, constitutivamente, por duas enzimas, a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS) e, em condições patológicas, como na inflamação, altos níveis de NO são produzidos a partir da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Bredt, 1999). Esse gás modula diversas funções fisiológicas essenciais em vários sistemas, incluindo o SNC (Yamamoto *et al.*, 2015). Embora seja um mediador neuronal fisiológico, sua produção excessiva está relacionada com comportamentos de ansiedade e depressão e na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (Deep *et al.*, 2016; Gammoh *et al.*, 2016; Seneviratne *et al.*, 2016).

As isoformas constitutivas da NOS são ativadas em resposta ao aumento intracelular das concentrações de cálcio gerado, por exemplo, pela despolarização da membrana do neurônio ou pela ativação do endotélio por receptores da acetilcolina (Coleman, 2001). Por outro lado, a isoforma induzível da NOS se liga à calmodulina em baixas concentrações intracelulares de cálcio devido à diferença na estrutura do sítio de ligação à calmodulina, o que confere alta afinidade pela enzima (Forstermann e Sessa, 2012). Assim, uma vez expressa, a iNOS está constantemente ativa, pois não tem sua função regulada pelas concentrações intracelulares de cálcio (Forstermann e Sessa, 2012).

A expressão da enzima iNOS é estimulada por sinais inflamatórios, como LPS e citocinas, tais como IL-1 e TNF- $\alpha$  (Luss *et al.*, 1995; Weinberg *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 2002). De fato, demonstrou-se que o TNF- $\alpha$  leva ao aumento da síntese de iNOS via NF- $\kappa$ B no córtex cerebral de ratos expostos ao estresse de restrição (Madrigal *et al.*, 2002). Há uma fase de atraso de várias horas entre a ativação celular e a produção de NO pela iNOS, refletindo o tempo necessário para a síntese proteica (Luss *et al.*, 1995; Semmler *et al.*, 2005). Um estudo mostrou um aumento da expressão de iNOS 12 horas após a injeção intrahipocampal de LPS e interferon- $\gamma$ , sendo o pico de expressão após 24 horas (Hartlage-Rubsamen *et al.*, 1999). Nesse estudo, essa enzima foi exclusivamente expressa pelas células microgliciais (Hartlage-Rubsamen *et al.*, 1999). Em contraste com as outras isoformas da NOS, a iNOS gera altas concentrações de NO e este nível de síntese é mantido por horas, dias ou mais, dependendo da taxa de expressão dessa enzima nas células ou tecidos (Coleman, 2001).

O NO tem múltiplos alvos no cérebro, sendo a forma solúvel da guanilato-ciclase o alvo mais extensamente caracterizado (Denninger e Marletta, 1999). O NO

liga-se à guanilato ciclase, enzima responsável pela produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e, através do GMPc, induz uma cascata de sinalização a partir da ativação da proteína quinase G (PKG), expressando seus efeitos (Nakane, 2003; Wang *et al.*, 2005). No SNC, essa enzima age sobre diversos substratos, regulando diversos processos da neurotransmissão, neurosecreção e plasticidade sináptica (Wang *et al.*, 2005; Calabrese *et al.*, 2007), incluindo a neurotransmissão glutamatérgica (Wang *et al.*, 2005; Calabrese *et al.*, 2007; Mallozzi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013).

Além disso, o NO está envolvido no estresse nitrosativo. Condições patológicas, tais como eventos inflamatórios, envolvem o aumento da produção de NO a partir da iNOS, além da produção de espécies reativas de oxigênio, resultando na formação de peroxinitrito, um potente agente oxidante (Calabrese *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2015).

Assim, propõe-se que a baixa concentração de NO liberado constitutivamente apresenta efeitos benéficos, mediando e protegendo a atividade dos neurônios no SNC (Dzolja *et al.*, 2015). Por outro lado, altas concentrações de NO pode ser significativamente prejudicial, gerando efeitos neurotóxicos importantes, estando envolvido na fisiopatologia de diversas doenças neurológicas e psiquiátricas (Dzolja *et al.*, 2015).

Há uma série de evidências que comprovam que a transmissão nitrérgica controla os estados emocionais relacionados à ansiedade e depressão possivelmente facilitando-os (Guimaraes *et al.*, 1994; Guimaraes *et al.*, 2005). A administração de doadores de NO e consequente aumento da neurotransmissão nitrérgica em regiões cerebrais relacionadas com comportamentos aversivos promove efeito do tipo ansiogênico (Braga *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2016). Além disso, animais submetidos a situações de estresse apresentam aumento significativo da expressão de nNOS e iNOS em regiões encefálicas relacionadas às reações de ansiedade (De Oliveira *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2012; Vila-Verde *et al.*, 2016). Estudos em humanos apontam para um aumentados níveis de metabólitos de NO em amostras de pacientes que tentaram suicídio (Lee *et al.*, 2006). Além disso, estudos *post mortem* identificaram maior nível da enzima iNOS no córtex frontal de pacientes com transtorno bipolar (Rao *et al.*, 2010).

Reforçando as evidências supracitadas, o tratamento farmacológico com inibidores seletivos das enzimas iNOS e/ou nNOS atenua as alterações comportamentais induzidas pelo estresse (Guimaraes *et al.*, 1994; De Oliveira *et al.*, 1997; Montezuma *et al.*, 2012; Aguilar-Valles *et al.*, 2015) e pela administração de LPS (Tomaz *et al.*, 2014), além de exercer efeitos neuroprotetores em modelos animais de

distúrbios neurológicos, como isquemia cerebral (Mesenge *et al.*, 1996) e doença de Parkinson (Hantraye *et al.*, 1996). Ainda, fármacos utilizados na clínica para tratamento da depressão e esquizofrenia podem mediar seus efeitos, parcialmente, por reduzirem a síntese de iNOS e, conseqüentemente, a exacerbação da produção de NO (Ribeiro *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2016). Dessa forma, esses dados fortalecem a hipótese do envolvimento do NO em diversas condições patológicas que acometem o SNC.

Em indivíduos obesos, assim como em modelos animais de obesidade, observam-se níveis plasmáticos aumentados dos produtos do metabolismo do NO (nitrito/nitrato), sugerindo um aumento da produção desse mediador na obesidade (Ghasemi *et al.*, 2013; Stanimirovic *et al.*, 2016). Além disso, em modelos animais de obesidade, observa-se aumento da expressão da iNOS em vários órgãos, como fígado, rim, e, no SNC, no hipotálamo (Morley *et al.*, 1995; Fujimoto *et al.*, 2005; Sherif, 2014). Sabe-se que a leptina, assim como as citocinas pró-inflamatórias, conforme discutido anteriormente, podem elevar as taxas de produção de NO em decorrência do aumento da expressão da enzima iNOS (Joffin *et al.*, 2012; Procaccini *et al.*, 2016).

Dessa forma, baseado nas evidências do processo inflamatório na obesidade e conseqüente aumento da produção de NO, além do envolvimento do NO nas respostas de ansiedade e estresse, é possível que as alterações comportamentais em decorrência da obesidade estejam relacionadas à maior expressão de iNOS e conseqüente aumento da transmissão nitrérgica em áreas relacionadas ao humor, sendo relevante estudos que explorem tal relação.



---

## *Objetivos*

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Testar a hipótese de que o consumo agudo ou crônico de uma dieta rica em carboidrato (HC) promoverá alterações comportamentais relacionadas à compulsão e ansiedade em decorrência da exacerbação da via do óxido nítrico em áreas cerebrais responsáveis pelo controle neural desses comportamentos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Verificar se o consumo de dieta HC altera o comportamento nos testes de Preferência Condicionada ao Lugar, Marble Burying, Labirinto em Zero Elevado e Hipofagia Induzida pela Novidade;
- Verificar se as alterações comportamentais observadas após o consumo de dieta HC estão relacionadas com o aumento de óxido nítrico, seja através dos níveis de nitrito ou através da expressão das isoformas neuronal e induzida da enzima óxido nítrico sintase no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo;
- Verificar se o bloqueio farmacológico da via do óxido nítrico reverte as alterações comportamentais e neuroquímicas promovidas pelo consumo da dieta HC;
- Verificar se o consumo crônico de dieta HC altera o número e a ativação de células microgliais no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo;
- Verificar se o consumo de dieta HC altera a liberação de glutamato de sinaptossomas estriatais.

---

*Material e Métodos*

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Balb/C* com idades de 4-5 semanas, para experimento crônico, ou 16-17 semanas, para experimento agudo, provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO – UFMG). Os animais foram mantidos em ambiente controlado, ração e água *ad libitum* e com ciclo claro-escuro de 12 horas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG): protocolo de número 110/2010.

#### 3.2 Dieta Experimental

A dieta experimental utilizada foi a dieta rica em carboidrato (HC), preparada na seguinte proporção: 40% de leite condensado, 40% de dieta comercial para roedores (NUVILAB), 12% de água e 8% de açúcar refinado. Dentre a composição total de carboidratos na dieta, 30% corresponde à sacarose (Tabela 1) (Oliveira *et al.*, 2013). Para a preparação da dieta HC, obteve-se o pó da ração comercial, acrescentou-se água, açúcar e leite condensando (Nestle®) e misturaram-se os ingredientes até obter uma massa homogênea. Em seguida, os *pellets* foram confeccionados manualmente e congelados em -20°C até a utilização. A dieta HC foi utilizada em até um mês após o seu preparo.

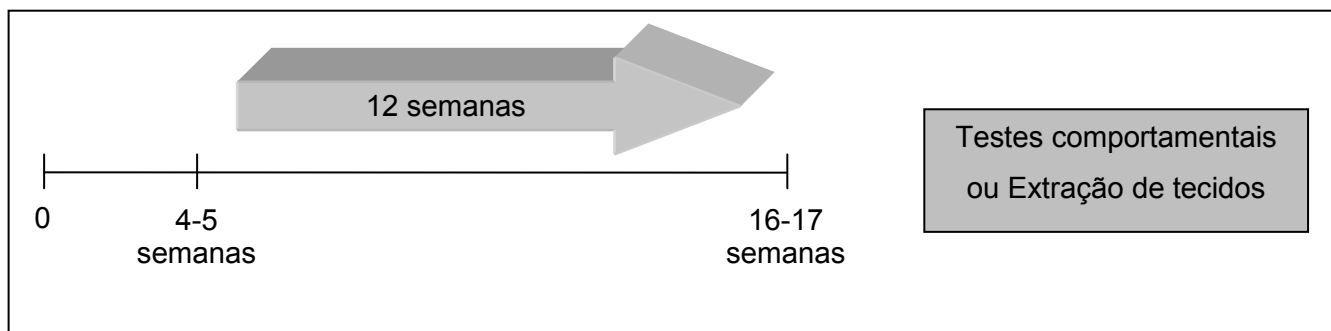
**Tabela 1-** Composição Nutricional das dietas controle e rica em carboidratos (HC)

	Dieta Controle	Dieta HC
Composição	g (%)	g (%)
Proteína	26,3	17,5
Carboidratos	55,6	64,8
Sacarose	8,0	30,0
Gordura	2,6	5,0
Kcal/g	4,0	4,4

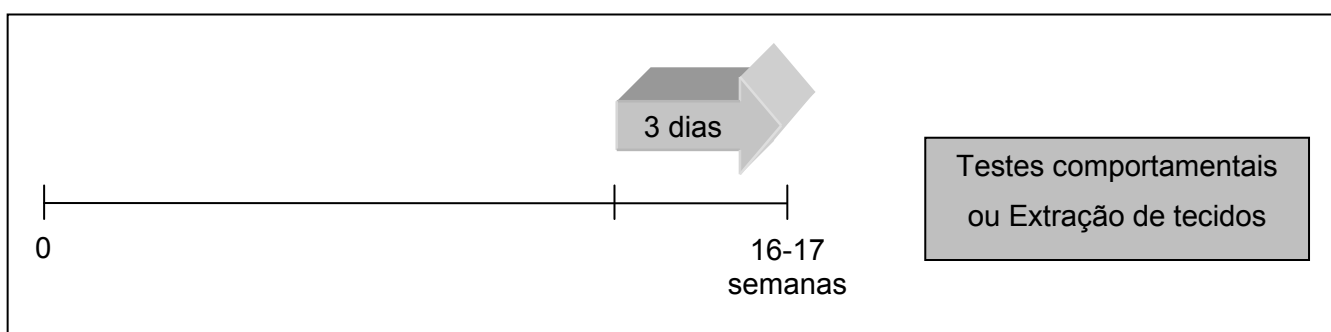
(Oliveira *et al.*, 2013)

### 3.3 Delineamento Experimental

Os animais foram alimentados com a dieta experimental ou dieta padrão durante 12 semanas (consumo crônico, Figura 1) ou 3 dias (consumo agudo, Figura 2). Após esse período, parte dos animais foi submetida aos testes comportamentais e outra parte foi eutanasiada para as análises bioquímicas e histológicas.



**Figura 1** Delineamento experimental: consumo crônico de dieta HC.



**Figura 2** Delineamento experimental: consumo agudo de dieta HC.

### 3.4 Consumo Alimentar e Adiposidade

A ração consumida foi registrada semanalmente (consumo crônico) ou diariamente (consumo agudo) para análise do consumo alimentar médio diário.

A adiposidade foi estimada pela relação entre o peso do tecido adiposo visceral, composto pelos tecidos adiposos epididimal (TAE), mesentérico (TAM) e retroperitoneal (TAR), e o peso do animal imediatamente antes do sacrifício, fornecendo o índice de adiposidade (IA), segundo fórmula a seguir:

$$IA (\%) = \frac{TAE + TAM + TAR}{\text{Peso do animal}} \times 100$$

### 3.5 Drogas

Foi utilizado o inibidor preferencial da iNOS [Aminoguanidina (Sigma®), dose de 50 e 75 mg/Kg] e seletivo da nNOS [n-propil-L( $\omega$ )-arginina(n-propil) (Tocris®), dose de 0,86  $\mu$ g/Kg] administrado pela via intraperitoneal (i.p.). Avaliou-se o efeito das doses de 50 e 75 mg/Kg de aminoguanidina no teste de Marble Burying a partir de trabalhos da literatura (Montezuma *et al.*, 2012; Amiri *et al.*, 2015). A escolha da dose de n-propil foi baseada em doses equipotentes de aminoguanidina considerando a magnitude de seus valores de Ki para nNOS (n-propil Ki = 57 nM ; aminoguanidina Ki = 3.3 mM) (Montezuma *et al.*, 2012).

Cloreto de Cocaína (Merck ®) dose de 15mg/kg administrada via i.p. (Mcgeehan e Olive, 2006)

Todas as drogas foram diretamente dissolvidas em solução salina (NaCl 0,9%) e administradas em um volume de 0,1 ml/10g de peso corporal.

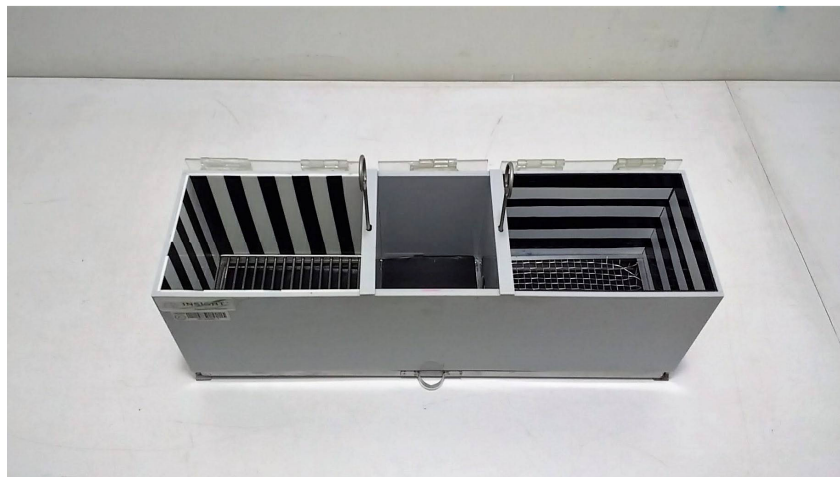
### 3.6 Testes Comportamentais

Os animais foram transportados em suas próprias gaiolas até a sala onde os testes de comportamento foram realizados uma hora antes do início de cada comportamento para adaptação ao ambiente experimental.

#### 3.6.1 Preferência Condicionada ao lugar

O teste de preferência condicionada ao lugar (CPP) foi realizado de acordo com trabalho Almeida-Santos *et al.* (2014) e Liddie *et al.* (2012) com pequenas modificações (Liddie *et al.*, 2012; Almeida-Santos *et al.*, 2014). O aparelho consistia numa caixa acrílica escura composta por duas câmaras, com tamanhos iguais (20 cm de comprimento, 15 de largura e 10 cm de altura) com portas (5 x 5 cm) ligando-as a um compartimento central (6 cm de comprimento, 15 cm de largura e 10 cm de altura; Figura 3). As paredes das câmaras laterais foram pintadas com faixas verticais (câmara A) ou horizontais (câmara B) intercaladas entre listras pretas e brancas e os

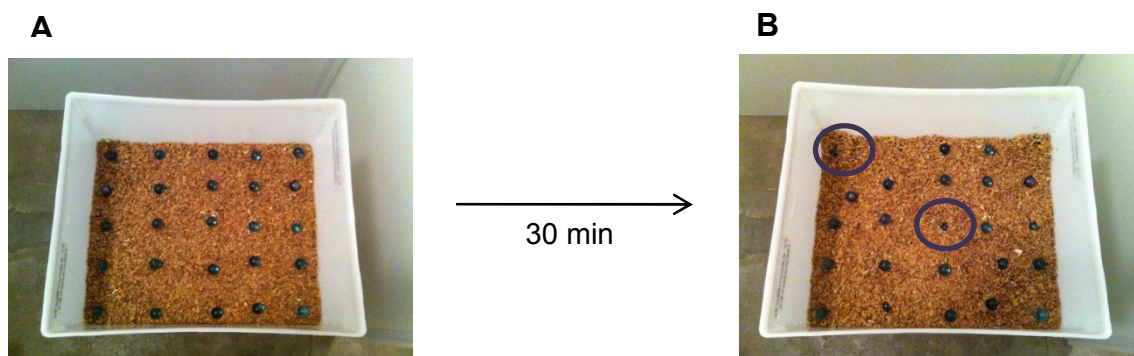
pisos consistiam em superfícies metálicas removíveis com hastes paralelas igualmente espaçadas (câmara A) ou orifícios circulares (câmara B). O teste consistiu em quatro fases, a saber, pré-condicionamento, condicionamento, teste e extinção. Na fase de pré-condicionamento (primeiro dia), cada animal foi colocado no compartimento central da caixa, com as portas abertas, podendo explorar livremente a caixa durante 30 min. O tempo gasto em cada compartimento foi registrado. Na fase de condicionamento (dias 2-7), os animais receberam injeções i.p. de veículo (nos dias 2, 4 e 6) e cocaína 15 mg/Kg (nos dias 3, 5 e 7) e foram imediatamente confinados em uma das câmaras por 30 minutos. No teste (dia 8), cada animal foi colocado no compartimento central, com as portas abertas, podendo explorar livremente a caixa durante 30 minutos e o tempo gasto em cada câmara foi registrado. Na fase de extinção (dias 9-14), os animais não receberam injeção de droga ou veículo e foram colocados no aparelho com as portas abertas, podendo explorar livremente a caixa durante 30 min. O tempo que o animal permaneceu em cada compartimento foi registrado nos dias 10, 12 e 14, consistindo no primeiro (Ext1), segundo (Ext2) e terceiro (Ext3) dias da extinção, respectivamente. Para o cálculo do índice de CPP para cada animal utilizou-se o tempo gasto no lado pareado com droga (câmaras A ou B, dependendo do animal) subtraído pelo tempo gasto no lado pareado com veículo. A análise comportamental foi realizada pelo software ANY-Maze (versão 4.5, Stoelting®) que calculou o tempo em que cada animal permaneceu nas câmaras A ou B.



**Figura 3** Modelo de condicionamento ao lugar. Aparelho utilizado no modelo de condicionamento ao lugar, formado por compartimentos com diferentes características.

### 3.6.2 Marble Burying

O teste foi realizado com adaptações mínimas de acordo com (Deacon 2006). Os animais foram individualmente colocados em uma nova caixa de policarbonato (30 x 40 x 12 cm) com 5 cm de maravalha durante cinco minutos. Os animais foram, então, retirados da caixa e receberam as respectivas injeções i.p. de droga [aminoguanidina (50 ou 75 mg/Kg) ou NP (0,86 µg/Kg)] ou veículo. Após 30 minutos, os animais foram reexpostos à mesma caixa contendo 25 esferas de vidro (1,5 cm de diâmetro). O número de esferas enterradas foi contabilizado manualmente por um investigador cego para o tratamento após uma sessão de 30 min. A esfera foi classificada como enterrada quando, no mínimo, dois terços de sua área estavam sob a maravalha (Figura 4).



**Figura 4** Teste de Marble Burying. Em A, caixa de policarbonato contendo 25 esferas de vidro distribuídas de forma equidistante sobre a maravalha. Em B, após sessão de 30 minutos, avaliação do número de esferas enterradas destacadas pelos círculos.

### 3.6.3 Labirinto em Zero Elevado

O teste de Labirinto em Zero Elevado (LZE) foi realizado de acordo com (Siopi *et al.*, 2012). O labirinto é composto por um anel circular (anel de 6,5 cm de largura com um diâmetro exterior de 55 cm) elevado a 60 cm acima do chão com quatro quadrantes alternados (dois abertos e dois fechados) (Figura 5). Os braços abertos apresentavam a borda transparente de 1 cm de altura, enquanto os braços fechados continham paredes de 15 cm de altura. O teste foi filmado com uma câmera de vídeo (Microsoft®) localizada acima do LZE e a análise comportamental realizada pelo software ANY-Maze (versão 4.5, Stoelting®), cujos cálculos foram: a porcentagem de tempo nos braços abertos, a porcentagem de entradas nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados do LZE.





**Figura 5** Modelo de Labirinto em Zero Elevado. Aparelho utilizado no teste de Labirinto em Zero Elevado formado por um anel circular suspenso do solo e composto por braços abertos e fechados intercalados.

#### 3.6.4 Hipofagia Induzida pela Novidade

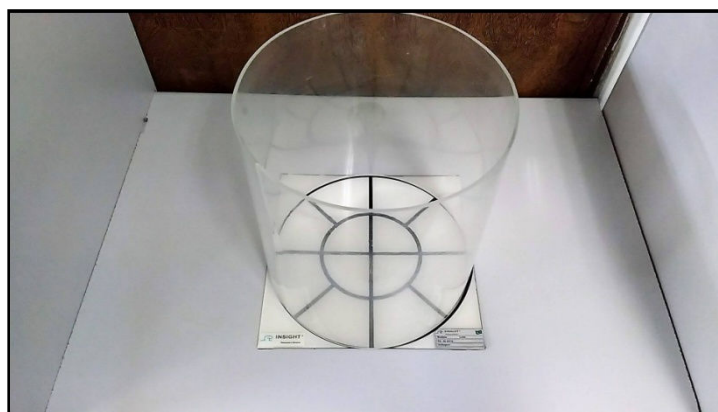
Para avaliação da Hipofagia Induzida pela Novidade, os animais foram privados de comida durante 24 horas antes do teste. No teste, os animais receberam as respectivas injeções i.p. de aminoguanidina (50 mg/Kg) ou veículo. Após 30 minutos, foram colocados individualmente em uma sala não iluminada e introduzidos em um novo ambiente (caixa de policarbonato - 30 x 40 x 12 cm - com 5 cm de maravalha) (Figura 6). Sob a maravalha, havia uma pequena superfície de vidro (placa de petri) localizada centralmente contendo um único *pellet* de ração (controle ou de dieta HC, de acordo com o respectivo grupo experimental), com um foco de luz direcionado para o *pellet* de ração. A latência para o primeiro episódio de comer foi avaliada com o auxílio de um cronômetro e, logo em seguida, os animais foram colocados em uma gaiola contendo *pellets* de ração controle ou dieta HC pré-pesados e a quantidade de alimento consumido durante 5 minutos foi mensurada (Yang *et al.*, 2015)



**Figura 6** Modelo de Hipofagia Induzida pela Novidade. Aparelho utilizado no teste de Hipofagia Induzida pela Novidade para avaliação da latência para o primeiro episódio de comer após privação alimentar. Em uma caixa de policarbonato, um único *pellet* de ração é iluminado centralmente.

### 3.6.5 Campo aberto

Utilizou-se uma arena circular para avaliar a atividade locomotora dos animais. Tal aparelho consistia de paredes acrílicas transparentes (30 cm) e chão preto (30 cm de diâmetro) (Figura 7). Cada animal foi colocado no centro da arena, onde permaneceu durante dez minutos. O teste foi filmado com uma câmera de vídeo (Microsoft®) localizada acima do campo aberto e a análise comportamental foi realizada pelo software ANY-Maze (versão 4.5, Stoelting®), que calculou a distância total percorrida no campo aberto (Santos, Ferreira *et al.* 2016).



**Figura 7** Modelo de campo aberto. Aparelho utilizado no teste de Campo Aberto para avaliação da atividade locomotora dos animais.

### 3.7 Análises Bioquímicas e Histológicas

#### 3.7.1 Dosagem de Nitrito

Os níveis de nitrito, uma medida indireta de NO, foram determinados com base na reação de Griess e expressos em  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína (Grisham *et al.*, 1996). Imediatamente após os testes comportamentais Marble Burying e Hipofagia Induzida pela Novidade, os animais foram eutanasiados por decapitação e o córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP) foram dissecados, rapidamente congelados em gelo seco e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A área cerebral foi homogeneizada com 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1 M gelado (pH 7,4), centrifugado (8000 rpm, 10 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ) e o sobrenadante recuperado. Cem  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram incubados durante 10 minutos com 100  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess à temperatura ambiente, que consistiu em 0,2% de naftilenoetilenodiamina e 2% de sulfanilamida em 5% ácido fosfórico. Utilizando um leitor de microplacas (Titertek Multiskan MCC/340; Flow Laboratories, McLean, VA), realizou-se a leitura em um comprimento de onda de 545 nm. Cada amostra foi realizada em duplicata. Determinou-se o teor de nitrito com base numa curva de nitrito padrão, gerada utilizando nitrito de sódio em água destilada em concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 e 1,56  $\mu\text{M}$  (Galdino *et al.*, 2015).

#### 3.7.2 Expressão das proteínas iNOS e nNOS

A expressão das proteínas iNOS e nNOS foi avaliada pela técnica de Western Blotting (Silva *et al.*, 2016). Após 12 semanas de exposição às dietas padrão ou HC, os animais foram eutanasiados por decapitação e o CPF, ST e HP foram dissecados, rapidamente congelado em gelo. As áreas cerebrais foram homogeneizadas com 200  $\mu\text{L}$  de tampão RIPA (pH 7,4), inibidores de protease (SigmaFAST®; Sigma) e 1% de Triton X-100, centrifugadas (8000 rpm, 10 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ) e o sobrenadante armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As proteínas foram desnaturadas e separadas por SDS/PAGE desnaturante (7,5% de gel). As proteínas (25  $\mu\text{g}$ ) foram, então, transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore). As membranas foram bloqueadas a  $18^{\circ}\text{C}$  com BSA a 2,5% em PBS contendo Tween 20 a 0,1% antes da incubação com anticorpo policlonal anti-nNOS rabbit (diluído 1:1000, SC-5302, Santa Cruz Biotechnology), anticorpo monoclonal anti-iNOS mouse (1:1000; SC- 7271, Santa Cruz Biotechnology) ou anti-actina monoclonal mouse (diluído 1:3000; SC- 47778) à

temperatura ambiente. Subsequentemente, as membranas foram incubadas com um anticorpo secundário específico conjugado com HRP. Os imunocomplexos foram detectados por reação de quimioluminescência (ECLRkit, Amersham, por reação quimioluminescente (ECL + kit, Amersham, Les Ulis, França) seguido de análises densitométricas usando o software ImageQuant.

### 3.7.3 Avaliação do número e ativação de células microgliais

Após 12 semanas de exposição às dietas padrão ou HC, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina (80 e 8 mg/kg, respectivamente) e perfundidos intracardialmente com solução salina tamponada com fosfato 1 x (PBS) seguida por Paraformaldeído 4%. Após a perfusão, os cérebros foram removidos e armazenados em Paraformaldeído a 4% durante 24 horas. Subsequentemente, os cérebros foram transferidos para uma solução de sacarose a 30%, foram congelados e depois armazenados a -80° C. Fatias sagitais de 25µm foram obtidas com o auxílio de um criostato (Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA).

A expressão de células microgliais foi registrada a partir de ensaio de imunofluorescência. As fatias foram inicialmente lavadas três vezes por 10 min. Em seguida, incubadas com tampão de citrato durante 1 hora a 70° C, lavadas com TBS duas vezes e incubadas durante 60 minutos em solução de bloqueio (1% de BSA e 0,5% de Triton-X 100 em TBS). A seguir, as fatias foram incubadas com anticorpo primário anti Iba-1 (1:400, Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, VA, EUA) por 48 horas a 4°C, seguido da incubação durante 1h com o anticorpo secundário Alexa Fluor 594 (1:1000, emissão de fluorescência vermelha; Invitrogen). As secções foram, então, montadas em lâminas gelatinizadas e cobertas por lamínulas usando Fluoromount como meio de montagem. (Rangaraju *et al.*, 2015). As fatias foram analisadas por microscopia de fluorescência (Zeiss Microscopy) e as imagens capturadas por câmera digital. Posteriormente, a quantificação das células marcadas foi realizada manualmente por um experimentador cego para o tratamento com o auxílio do software ImageJ (Image J 1.4q National Institute of Health, USA).

Para análise de Ativação Microglial, as fatias foram incubadas com tampão de citrato durante 1 hora a 70° C para a recuperação antigênica. Após este período, as fatias foram lavadas 3 vezes com TBS e depois bloqueadas durante 60 minutos em solução de bloqueio (1% de BSA e 0,5% de Triton-X 100 em TBS). A seguir, as fatias foram incubadas durante 48 h a 4° C com anticorpo primário anti-Iba-1 marcador de

células microgliais, 1: 500 (Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, VA, EUA), seguida de uma incubação com anticorpo secundário à temperatura ambiente durante uma hora (1: 500, VECTASTAIN Elite ABC Kit - VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, EUA). A coloração foi revelada pelo tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Posteriormente, as seções foram montadas em lâminas de vidro e fotografadas em um microscópio Zeiss (Axio Imager A2, Carl Zeiss) e foram fotografadas com o auxílio de uma câmera digital conectada ao microscópio (Lima, Campos et al., 2016). As imagens foram analisadas usando o software ImageJ (Image J 1.4q National Institute of Health, Bethesda MD, EUA). Utilizando o limiar de ajuste e análise de funções de partículas no software ImageJ, os limiares de intensidade e o filtro de tamanho foram aplicados para medir o tamanho total do corpo celular e o tamanho total da célula, de acordo com o método utilizado por Hovens *et al.* (2014). O índice de ativação microglial (%) foi calculado a partir da relação entre a área do corpo celular e a área da célula e foi utilizado como parâmetro para determinar a ativação microglial (Hovens *et al.*, 2014).

As áreas anatômicas avaliadas foram: córtex pré-frontal (regiões Cg1, Prl e IL), núcleo estriado (regiões Core e Shell), hipocampo (regiões CA1, CA3 e giro denteado). Foram analisadas, por animal, três seções imuno-marcadas por um investigador cego para o tratamento no experimento de ativação microglial.

#### 3.7.4 Purificação de sinaptossomas e medição da liberação contínua de glutamato

Após 12 semanas ou 3 dias de tratamento com dietas padrão ou dieta HC, os animais foram eutanasiados por decaptação e tiveram o ST removido e homogeneizado em sacarose 0,32 M de 1:10 (p/v) contendo ditiotreitol 0,25 mM e EDTA 1 mM. Os homogenatos foram, então, submetidos à centrifugação a baixa velocidade (1000×g/10 min) e os terminais nervosos isolados (sinaptossomas) foram purificados a partir do sobrenadante por centrifugação descontínua de gradiente de densidade de Percoll (Dunkley *et al.*, 1988). Os sinaptossomas isolados foram ressuspensos em 400 µL de solução de Krebs-Ringer-HEPES [KRH (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, glucose 10 mM, HEPES 25 mM, pH 7,4)] e mantidos em gelo até a sua utilização para a quantificação da liberação de glutamato. Resumidamente, para a medição da liberação contínua de glutamato, foram adicionados 300 µL de sinaptossomas em poços das microplacas ELISA (aproximadamente 30 µg de proteína/poço) com CaCl<sub>2</sub> (1 mM), NADP<sup>+</sup> (1 mM, SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA) em solução de KRH e ligados a um

espectrofluorímetro (Biotek Synergy 2, Wino, EUA). A adição de  $\text{CaCl}_2$  foi omitida no experimento realizado na presença de 1,0 mM de EGTA para avaliação da liberação de glutamato independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Glutamato-desidrogenase (GDH) (35 unidades/poço Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado aos sinaptossomas estriatais seguido da adição de KCl 33 mM para avaliação da despolarização evocada da membrana. A medição do glutamato foi realizada pelo aumento da fluorescência devido à produção de  $\text{NADPH}^+$  na presença de glutamato desidrogenase e  $\text{NADP}^+$  (Nicholls *et al.*, 1987). A emissão de fluorescência foi registrada a 450 nm e o comprimento de onda de excitação foi ajustado a 360 nm. Os resultados foram expressos como nMol de glutamato liberado por mg de proteína.

### **3.8 Análises Estatísticas**

As análises estatísticas e a elaboração gráfica dos resultados foram realizadas utilizando GraphPad Prism Software®, versão 5.0 para Windows (San Diego, Califórnia, EUA). Para o experimento crônico com dieta HC, o número de esferas enterradas, a latência e consumo no teste de Hipofagia Induzida pela Novidade, a distância percorrida no campo aberto, os índices de CPP e os níveis de nitrito foram submetidos à análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Os demais dados do experimento agudo e crônico foram analisados pelo teste t de Student. A significância estatística foi definida como  $p < 0,05$ .

---

## *Resultados*

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Peso corporal, consumo alimentar e adiposidade

O consumo alimentar médio e o peso final dos animais não diferiram entre os grupos (consumo:  $t_{(22)} = 1,172$ ;  $p > 0,05$ ; peso:  $t_{(13)} = 0,1711$ ;  $p > 0,05$ , Teste t de Student, Tabela 2). Os pesos dos tecidos adiposos foram significativamente maiores nos animais alimentados cronicamente com dieta HC em relação aos animais alimentados com dieta controle, com exceção do tecido adiposo marrom (EPI:  $t_{(13)} = 4,282$ ;  $p < 0,05$ ; ING:  $t_{(13)} = 3,723$ ;  $p < 0,05$ ; MES:  $t_{(13)} = 2,581$ ;  $p < 0,05$ ; RET:  $t_{(13)} = 3,703$ ;  $p < 0,05$ ; MAR:  $t_{(13)} = 1,967$ ;  $p > 0,05$ ; teste t de Student). Além disso, o índice de adiposidade também apresentou-se aumentado nesses animais ( $t_{(13)} = 4,939$ ;  $p < 0,05$ , Teste t de Student).

**Tabela 2** - Efeito do consumo crônico de dieta HC sobre o consumo alimentar diário médio, peso corporal final e adiposidade.

	DIETA CONTROLE	DIETA HC
<b>Peso (g)</b>	33,59 ± 0,30	33,80 ± 1,26
<b>Consumo (g/dia)</b>	5,70 ± 0,18	5,96 ± 0,13
<b>EPI (g)</b>	0,11 ± 0,023	0,54 ± 0,10*
<b>MES (g)</b>	0,24 ± 0,034	0,42 ± 0,065*
<b>RET (g)</b>	0,013 ± 0,003	0,083 ± 0,020*
<b>ING (g)</b>	0,082 ± 0,014	0,30 ± 0,060*
<b>MAR (g)</b>	0,090 ± 0,011	0,13 ± 0,015
<b>IA (%)</b>	1,10 ± 0,16	3,02 ± 0,38*

Os valores representam a média ± E.P.M. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Dieta controle,  $n = 7-8$  (Teste t de Student). EPI = Tecido Adiposo Epididimal; MES = Tecido Adiposo Mesentérico; RET = Tecido Adiposo Retroperitoneal; ING = Tecido Adiposo Inguinal; MAR = Tecido Adiposo Marrom; IA = Índice de Adiposidade.

Na exposição aguda à dieta HC, o consumo alimentar durante os três dias foi significativamente maior no grupo dieta HC comparado ao grupo controle ( $t_{(6)} = 3,516$ ;  $p < 0,05$ ; Teste t de Student, Tabela 3), enquanto o peso corporal dos animais controle foi significativamente maior quando comparado ao grupo dieta HC ( $t_{(19)} = 2,295$ ;  $p < 0,05$ ; Teste t de Student). Além disso, observou-se que os animais do grupo dieta HC mostraram maior índice de adiposidade e maior peso dos tecidos adiposos (IA:  $t_{(19)} = 3,310$ ;  $p < 0,05$ ; EPI:  $t_{(19)} = 2,108$ ;  $p < 0,05$ ; ING:  $t_{(19)} = 2,563$ ;  $p < 0,05$ ; MES:  $t_{(19)} = 2,928$ ;  $p < 0,05$ ; RET:  $t_{(19)} = 2,496$ ;  $p < 0,05$ ; MAR:  $t_{(19)} = 3,554$ ;  $p < 0,05$ ; Teste t de Student).



**Tabela 3** - Efeito do consumo agudo de dieta HC sobre o consumo alimentar médio, peso corporal e adiposidade.

	<b>DIETA CONTROLE</b>	<b>DIETA HC</b>
<b>Peso (g)</b>	31,82 ± 0,423 <sup>#</sup>	30,60 ± 0,306
<b>Consumo (g/dia)</b>	5,590 ± 0,1286	7,444 ± 0,5112*
<b>TAE (g)</b>	0,233 ± 0,031	0,322 ± 0,028*
<b>TAM (g)</b>	0,309 ± 0,059	0,5343 ± 0,048*
<b>TAR (g)</b>	0,042 ± 0,009	0,074 ± 0,009*
<b>TAI (g)</b>	0,199 ± 0,029	0,302 ± 0,027*
<b>MAR (g)</b>	0,097 ± 0,007	0,166 ± 0,019*
<b>IA (%)</b>	1,82 ± 0,272	3,007 ± 0,226*

Os valores representam a média ± E.P.M. \*p<0,05 em relação ao grupo Dieta controle, n=11-12/grupo (Teste t de Student). TAE = Tecido Adiposo Epididimal; TAM = Tecido Adiposo Mesentérico; TAR = Tecido Adiposo Retroperitoneal; TAI = Tecido Adiposo Inguinal; MAR = Tecido Adiposo Marrom; IA = Índice de Adiposidade.

## 4.2 Avaliações de comportamento e níveis de nitrito

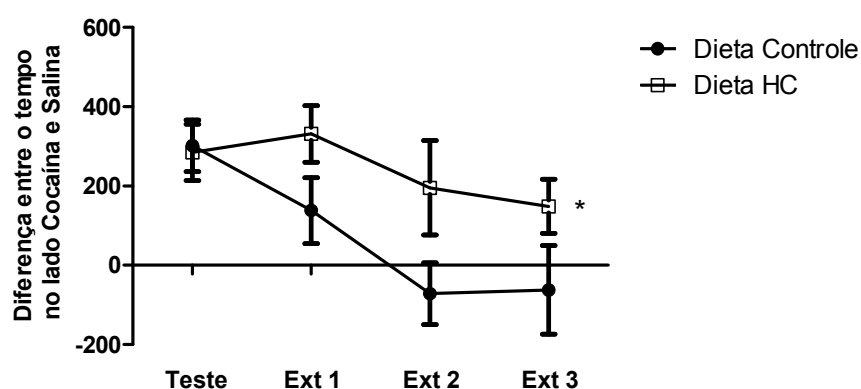
### 4.2.1 Teste de Preferência Condicionada ao Lugar

No modelo de preferência condicionada ao lugar, os animais dos grupos dieta controle e dieta HC mostraram preferência ao compartimento pareado com cocaína no dia do teste quando comparado ao dia do pré-condicionamento. Além disso, a aquisição do condicionamento ao lugar induzida pela cocaína não diferiu entre os grupos dieta controle e dieta HC (efeito dieta  $F_{1,54} = 0,1253$ ;  $p > 0,05$ ; efeito tempo  $F_{1,54} = 16,03$ ;  $p < 0,05$ ; efeito de interação  $F_{1,54} = 0,063$ ;  $p > 0,05$ . ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni, Tabela 4). Entretanto, na análise da extinção do condicionamento, observamos que o grupo dieta HC apresenta prejuízo da extinção da preferência ao lugar induzida pela cocaína, uma vez que verificamos efeito da dieta (efeito dieta  $F_{1,26} = 4,371$ ;  $p < 0,05$ ; efeito tempo  $F_{3,26} = 5,441$ ;  $p < 0,05$ ; efeito de interação  $F_{3,26} = 1,351$ ;  $p > 0,05$ . ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni, Figura 8).

**Tabela 4** - Efeito do consumo crônico de dieta HC sobre a aquisição do condicionamento ao lugar induzido pela cocaína

	DIETA CONTROLE	DIETA HC
<b>Pré-condicionamento</b>	$-11,00 \pm 57,46$	$-4,071 \pm 53,25$
<b>Teste</b>	$243,7 \pm 83,78^*$	$284,8 \pm 71,08^\#$

Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo dieta controle pré-condicionamento,  $^\#p < 0,05$  em relação ao grupo dieta HC pré-condicionamento,  $n=14-15$ /grupo (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni).



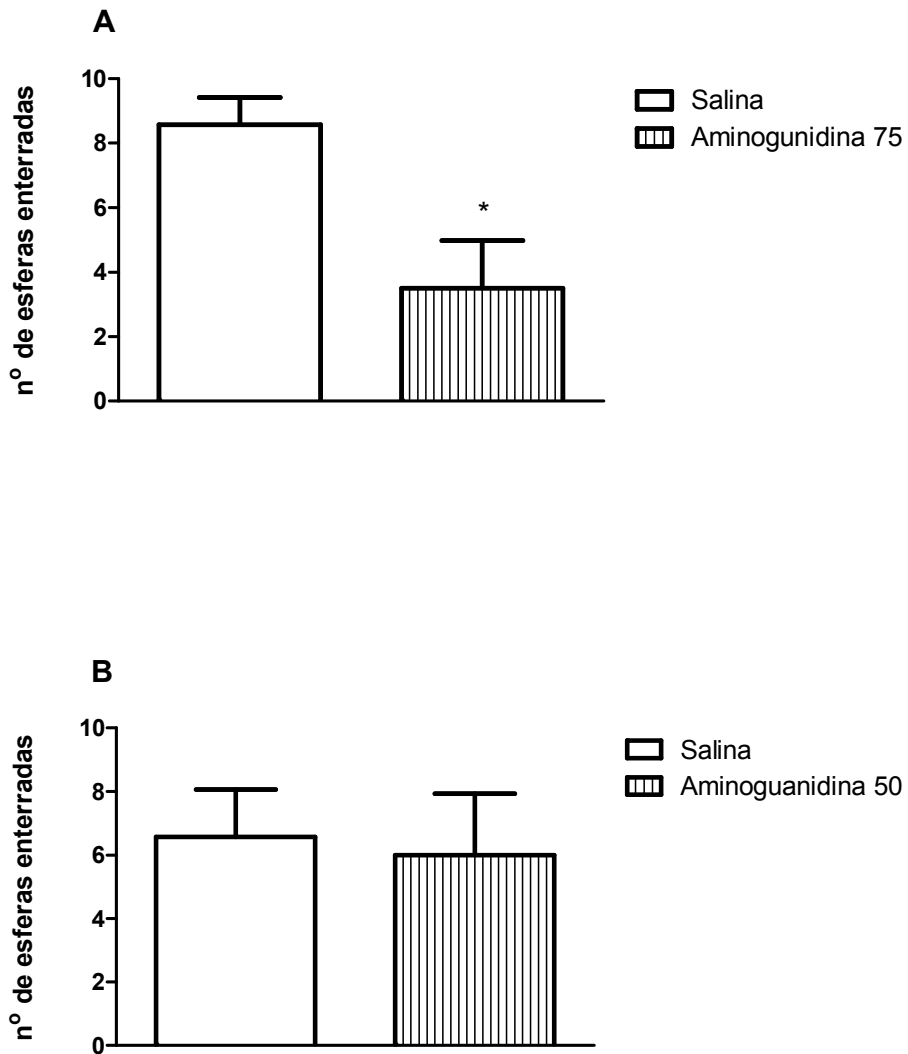
**Figura 8** Efeito do consumo crônico de dieta HC na extinção do condicionamento ao lugar induzido por cocaína. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo dieta controle,  $n=14-15$ /grupo (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

#### 4.2.2 Teste de Marble Burying

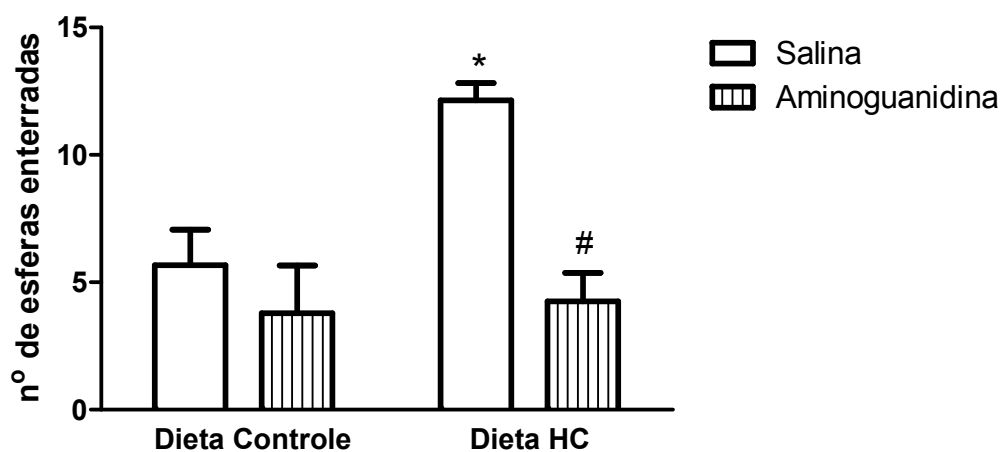
Com o objetivo de determinar qual dose de aminoguanidina seria utilizada, verificamos, inicialmente, o efeito das doses de 50 e 75 mg/kg no teste do Marble Burying em animais controle. Verificou-se que a dose de 75 mg/Kg reduziu significativamente o número de esferas enterradas quando comparado aos animais que receberam veículo ( $t_{(11)} = 3,098$ ,  $p < 0,05$ , teste t de Student, Figura 9A), sugerindo um efeito do tipo anti-compulsivo, enquanto a dose de 50 mg/kg não diferiu do grupo controle ( $t_{(12)} = 0,2334$ ,  $p > 0,05$ , teste t de Student, Figura 9B). Por esse motivo, a dose de 50 mg/Kg foi utilizada nos experimentos subsequentes.

No teste do Marble Burying, verificou-se que os animais alimentados cronicamente com a dieta HC enterraram maior número de esferas quando comparado aos animais da dieta controle (efeito dieta  $F_{1,22} = 7,685$ ;  $p < 0,05$ ; efeito fármaco  $F_{1,22} = 15,25$ ;  $p < 0,05$ ; efeito de interação dieta X fármaco  $F_{1,22} = 5,816$ ;  $p < 0,05$ . ANOVA de duas vias, Figura 10). Verificou-se, ainda, que o pré-tratamento com aminoguanidina reverteu esse efeito da dieta HC nesse modelo (Bonferroni,  $p < 0,05$ , Figura 10). Esse efeito da dieta no comportamento foi acompanhado por um aumento dos níveis de nitrito no CPF e ST (CPF: efeito dieta  $F_{1,29} = 39,82$ ;  $p < 0,05$ ; efeito fármaco  $F_{1,29} = 4,567$ ;  $p < 0,05$ ; efeito de interação dieta X fármaco  $F_{1,29} = 1,695$ ;  $p > 0,05$ . ST: efeito dieta  $F_{1,29} = 40,93$ ;  $p < 0,05$ ; efeito fármaco  $F_{1,29} = 5,503$ ;  $p < 0,05$ ; efeito de interação dieta X fármaco  $F_{1,29} = 6,385$ ;  $p < 0,05$ . HP: efeito dieta  $F_{1,26} = 3,835$ ;  $p > 0,05$ ; efeito fármaco  $F_{1,26} = 0,07027$ ;  $p > 0,05$ ; efeito de interação  $F_{1,26} = 2,298$ ;  $p > 0,05$ . ANOVA de duas vias, Figura 11). O pré-tratamento com aminoguanidina também foi capaz de reduzir significativamente os níveis de nitrito no CPF e ST, embora o efeito significativo em relação aos animais dieta HC tenha ocorrido apenas no ST (Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

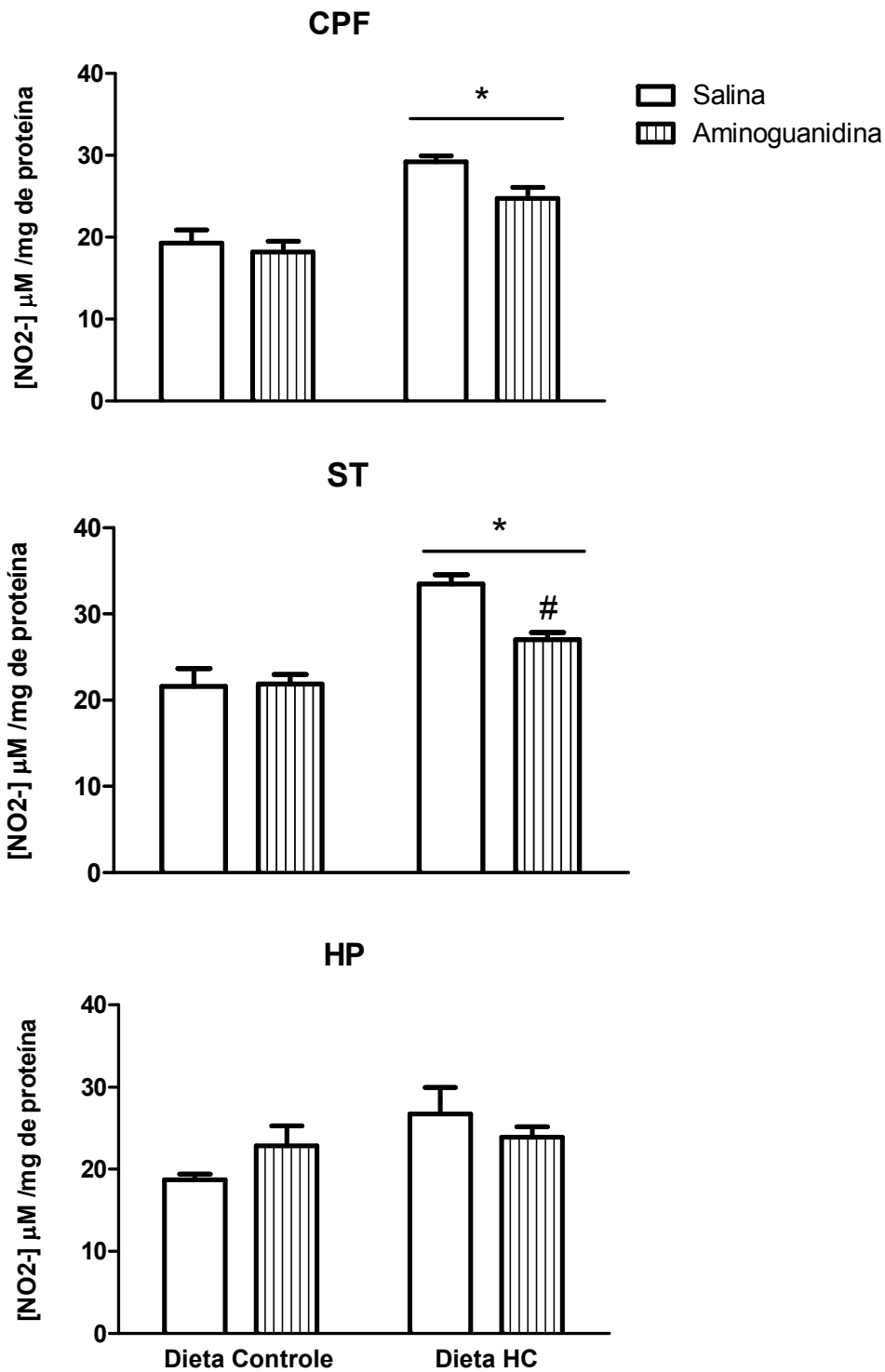
Já o pré-tratamento com o inibidor da nNOS, n-propil, não foi capaz de atenuar o efeito induzido pela dieta HC no comportamento de enterrar esferas (efeito dieta  $F_{1,34} = 6,509$ ;  $p < 0,05$ ; efeito fármaco  $F_{1,34} = 0,8276$ ;  $p > 0,05$ ; efeito de interação dieta X fármaco  $F_{1,34} = 2,681$ ;  $p > 0,05$ . ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni, Figura 12).



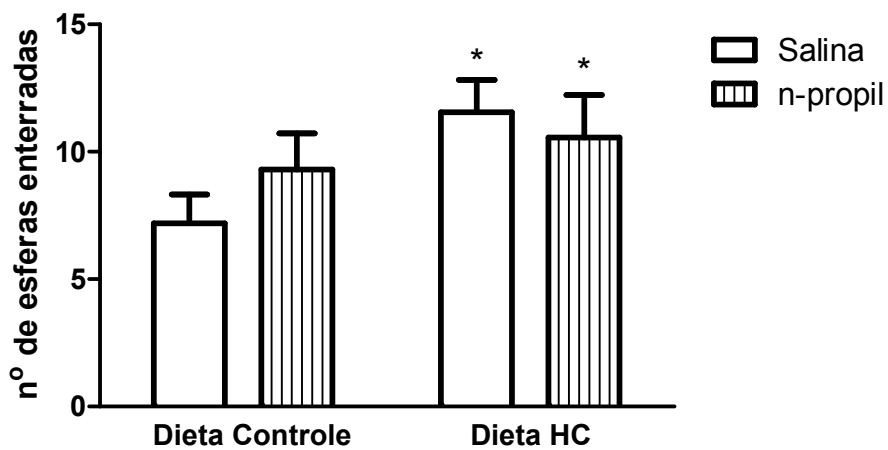
**Figura 9** Efeito da aminoguanidina no teste de Marble Burying nas doses de 75 mg/kg (A) e 50 mg/kg (B). As barras representam a média ± E.P.M. do número de esferas enterradas, \* $p < 0,05$  em relação ao grupo salina,  $n=6-7$ /grupo (Teste t de Student).



**Figura 10** Efeito da aminoguanidina (50 mg/Kg) no teste de Marble Burying em animais alimentados cronicamente com dieta controle ou dieta HC. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do número de esferas enterradas, \* $p < 0,05$  em relação ao grupo salina + dieta controle; #  $p < 0,05$  relação ao grupo salina + dieta HC,  $n = 6-8$ /grupo (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

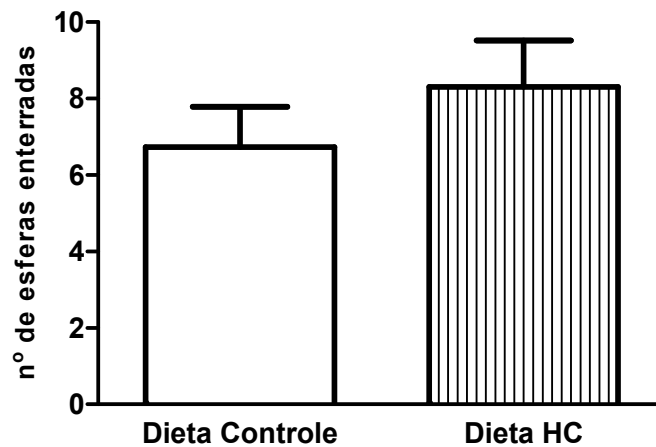


**Figura 11** Efeito da aminoguanidina (50 mg/Kg) sobre os níveis de nitrito no córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP) de animais alimentados cronicamente com dieta controle ou dieta HC e submetidos ao teste do Marble Burying. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M dos níveis de nitrito em  $\mu\text{M}$ /mg de proteína. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo salina + dieta controle ; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina + dieta HC,  $n = 8-9$ /grupo (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).



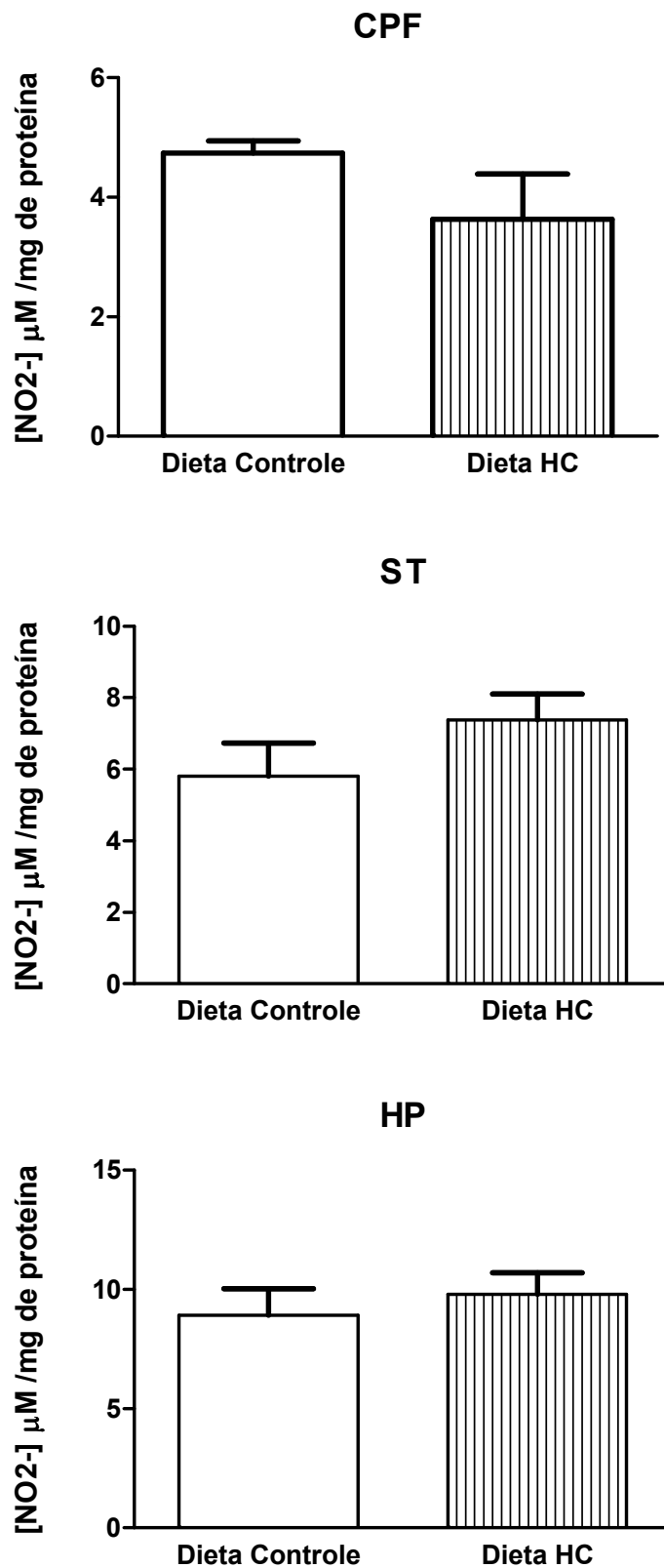
**Figura 12** Efeito do n-propil (0,86  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) no teste de Marble Burying em animais alimentados cronicamente com dieta controle ou dieta HC. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do número de esferas, \* $p < 0,05$  em relação ao grupo salina + dieta controle,  $n = 10-9/\text{grupo}$  (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

No experimento agudo, observamos que o consumo da dieta HC por três dias não alterou o número de esferas enterradas ( $t_{(12)} = 0,7083$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student, Figura 13). Além disso, nenhuma alteração foi observada nos níveis de nitrito em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas (CPF:  $t_{(12)} = 1,409$ ,  $p > 0,05$ ; ST:  $t_{(12)} = 1,339$ ,  $p > 0,05$ ; HP:  $t_{(12)} = 0,6131$ ,  $p > 0,05$ . Teste t de Student, Figura 14).



**Figura 13** Efeito do consumo agudo de dieta HC sobre o número de esferas enterradas no teste do Marble Burying. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do número de esferas enterradas,  $n=10-11$ /grupo (Teste t de Student).

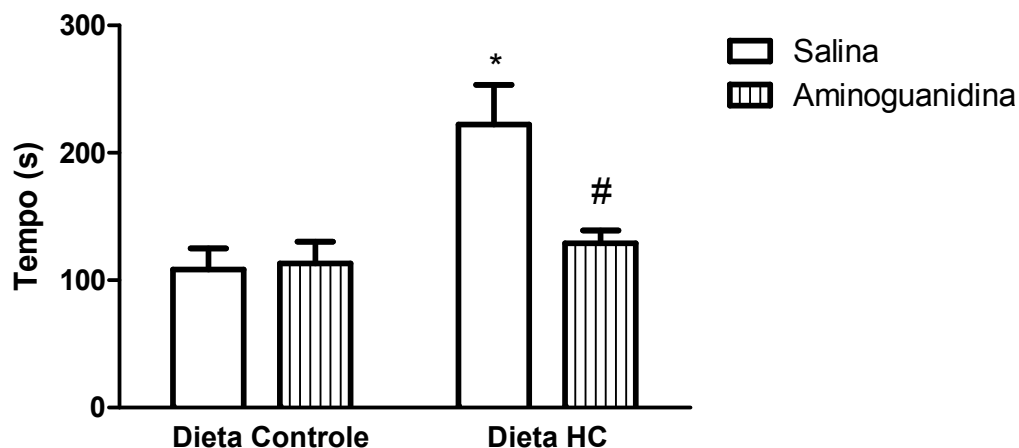




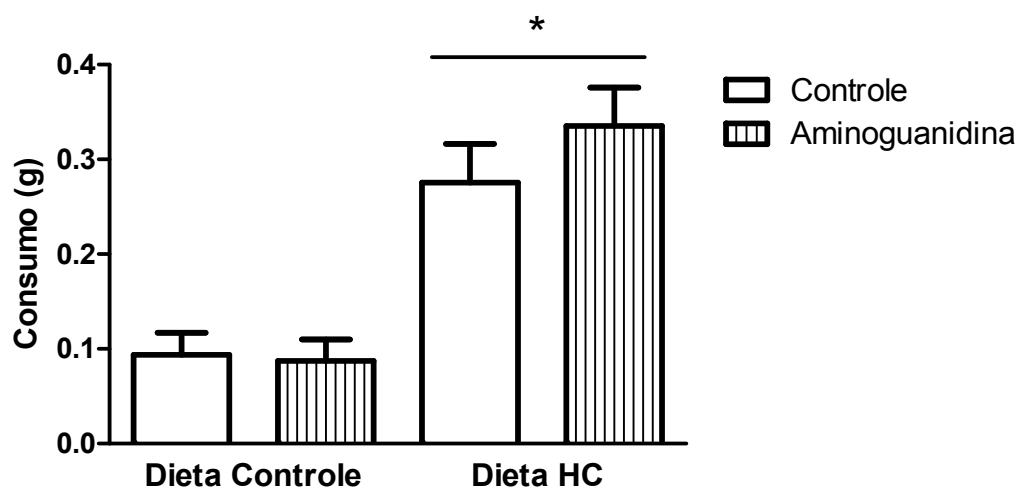
**Figura 14** Níveis de nitrito córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP) de animais alimentados agudamente com dieta controle ou dieta HC e submetidos ao teste do Marble Burying. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M dos níveis de nitrito em  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína,  $n=7/\text{grupo}$  (Teste t de Student).

#### 4.2.3 Modelo de Hipofagia Induzida pela Novidade

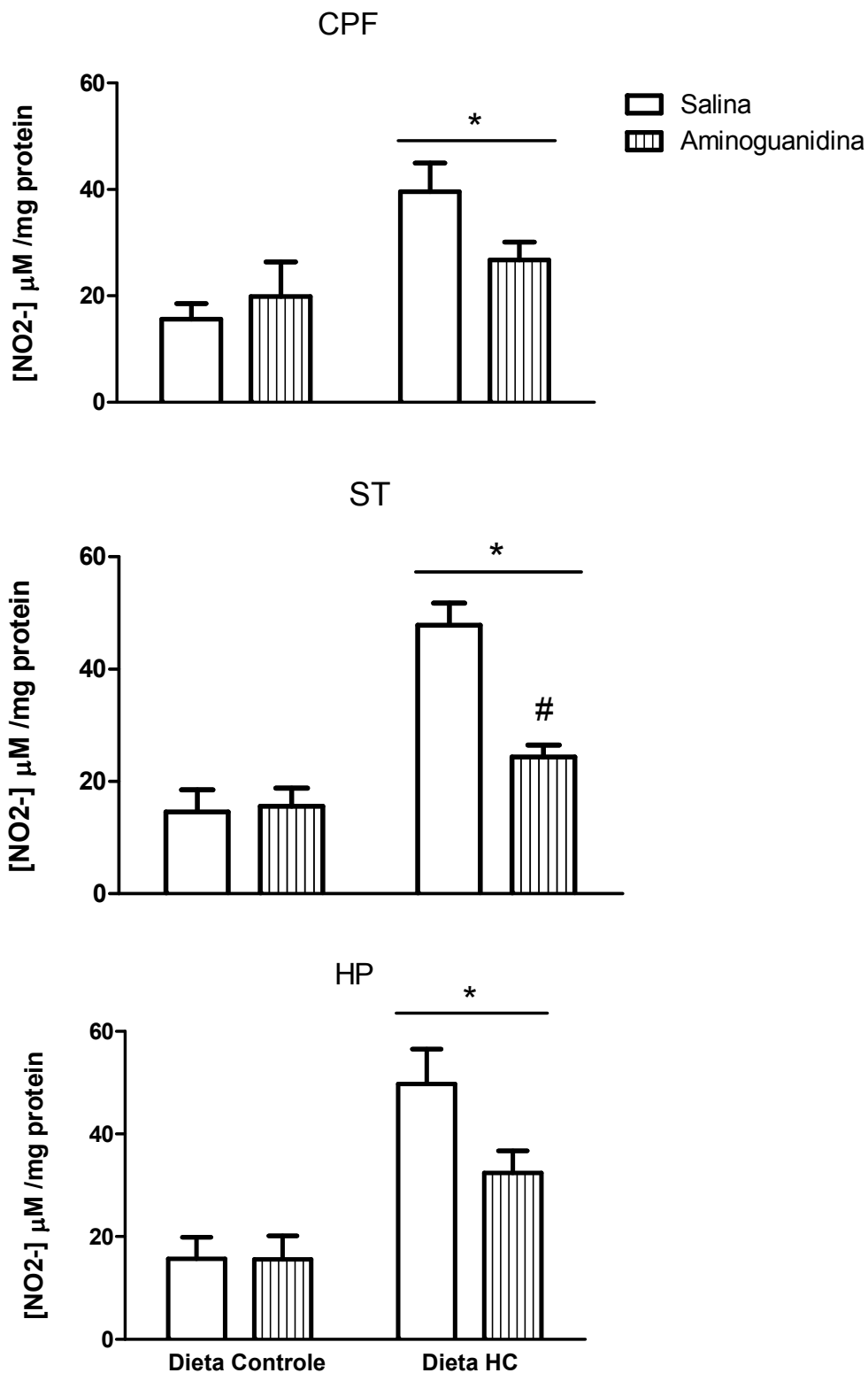
No teste de Hipofagia Induzida pela Novidade, observou-se que, comparado aos animais da dieta controle, os animais alimentados com dieta HC apresentaram maior latência para alimentar-se (efeito dieta  $F_{1,46} = 9,911$ ;  $p < 0,05$ ; efeito fármaco  $F_{1,46} = 4,587$ ;  $p < 0,05$ ; efeito de interação dieta X fármaco  $F_{1,46} = 5,646$ ;  $p < 0,05$ . ANOVA de duas vias, Figura 15). O pré-tratamento com aminoguanidina (50 mg/Kg) foi capaz de atenuar o efeito promovido pela dieta (Bonferroni,  $p < 0,05$ , Figura 15). Nesse modelo, foi observado o aumento nos níveis de nitrito no grupo dieta HC em todas as áreas cerebrais avaliadas (CPF: efeito dieta  $F_{1,27} = 10,72$ ;  $p < 0,05$ ; efeito fármaco  $F_{1,27} = 0,8256$ ;  $p > 0,05$ ; efeito de interação dieta X fármaco  $F_{1,27} = 3,336$ ;  $p > 0,05$ . ST: efeito dieta  $F_{1,27} = 40,14$ ;  $p < 0,05$ ; efeito fármaco  $F_{1,27} = 11,53$ ;  $p < 0,05$ ; efeito de interação dieta X fármaco  $F_{1,29} = 13,62$ ;  $p < 0,05$ . HP: efeito dieta  $F_{1,27} = 24,61$ ;  $p < 0,05$ ; efeito fármaco  $F_{1,27} = 2,905$ ;  $p > 0,05$ ; efeito de interação dieta X fármaco  $F_{1,27} = 2,823$ ;  $p > 0,05$ . ANOVA de duas vias, Figura 17). O pré-tratamento com aminoguanidina (50 mg/Kg) atenuou significativamente esse efeito no ST (Bonferroni  $p < 0,05$ , Figura 17). Interessantemente, houve uma correlação positiva entre o tempo de latência e os níveis de nitrito observados no ST e HP (ST:  $r^2 = 0,2816$ ,  $p < 0,05$ . Correlação de Pearson. HP:  $r^2 = 0,1480$ ,  $p < 0,05$ , Correlação de Pearson, Figura 18), mas não no CPF ( $r^2 = 0,1063$   $p > 0,05$ , Correlação de Pearson). O consumo alimentar durante os cinco minutos subsequentes ao comportamento foi maior nos animais que receberam dieta HC do que nos animais controle, independentemente do tratamento (efeito dieta  $F_{1,39} = 29,00$ ;  $p < 0,05$ ; efeito fármaco  $F_{1,39} = 0,4484$ ;  $p > 0,05$ ; efeito de interação dieta X fármaco  $F_{1,39} = 0,6831$   $p > 0,05$ , ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni, Figura 16). Entretanto, a maior ou menor ingesta dos grupos não se correlacionaram com a latência observada na avaliação do comportamento (Controle Salina:  $r = 0,05418$ ,  $p > 0,05$ ; Controle aminoguanidina:  $r = -0,6887$ ,  $p > 0,05$ ; Dieta HC salina:  $r = 0,2804$ ,  $p > 0,05$ ; Dieta HC aminoguanidina:  $r = 0,02520$ ,  $p > 0,05$ , Correlação de Pearson).



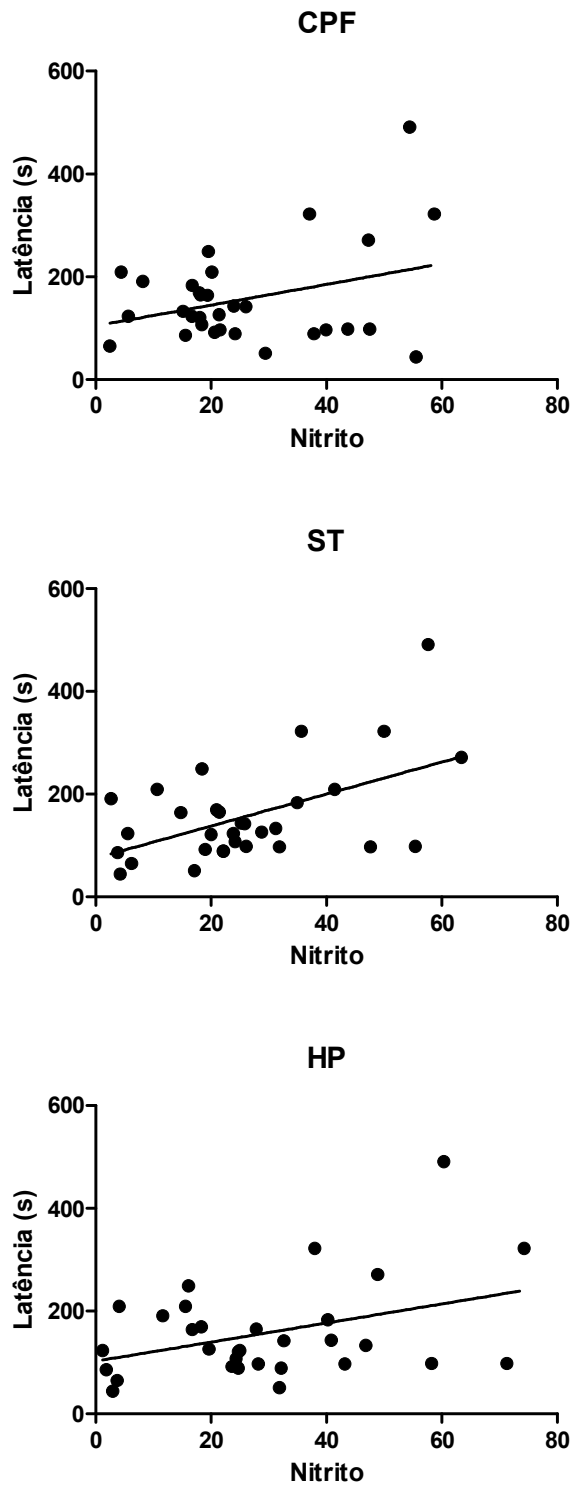
**Figura 15** Efeito aminoguanidina (50 mg/Kg) sobre a latência do primeiro episódio de alimentação no teste de Hipofagia Induzida pela Novidade em animais que receberam dieta controle ou dieta HC cronicamente. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M do tempo de latência em segundos. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo salina + dieta controle; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina + dieta HC,  $n = 12-14$ /grupo (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).



**Figura 16** Consumo alimentar após o teste de Hipofagia Induzida pela Novidade. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do consumo em g. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo dieta controle,  $n = 8-14$ /grupo (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

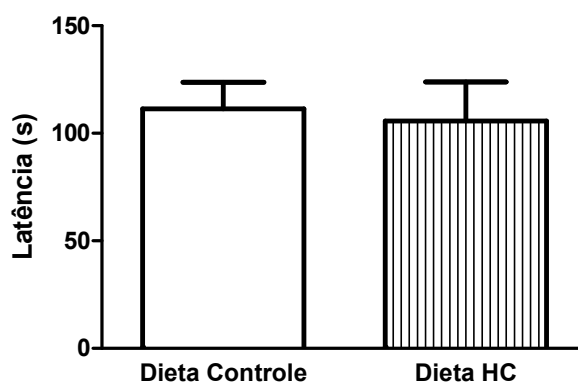


**Figura 17** Efeito da aminoguanidina (50 mg/Kg) sobre os níveis de nitrito córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP) de animais alimentados com dieta controle ou dieta HC e submetidos ao modelo de Hipofagia Induzida pela novidade. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M dos níveis de nitrito em  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo salina + dieta controle; # $p < 0,05$  em relação ao grupo salina + dieta HC,  $n = 7-9/\text{grupo}$  (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

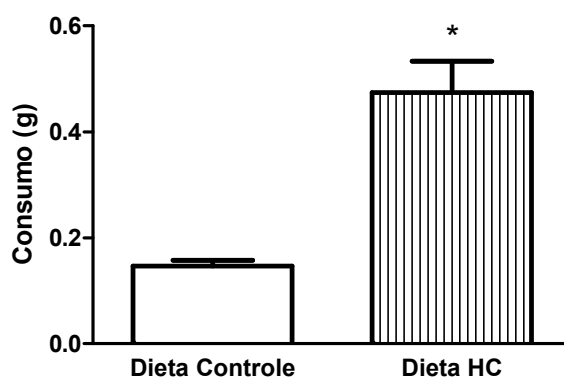


**Figura 18** Correlação entre os níveis de nitrito do córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP) e a latência no teste de Hipofagia Induzida pela Novidade (Correlação de Pearson).

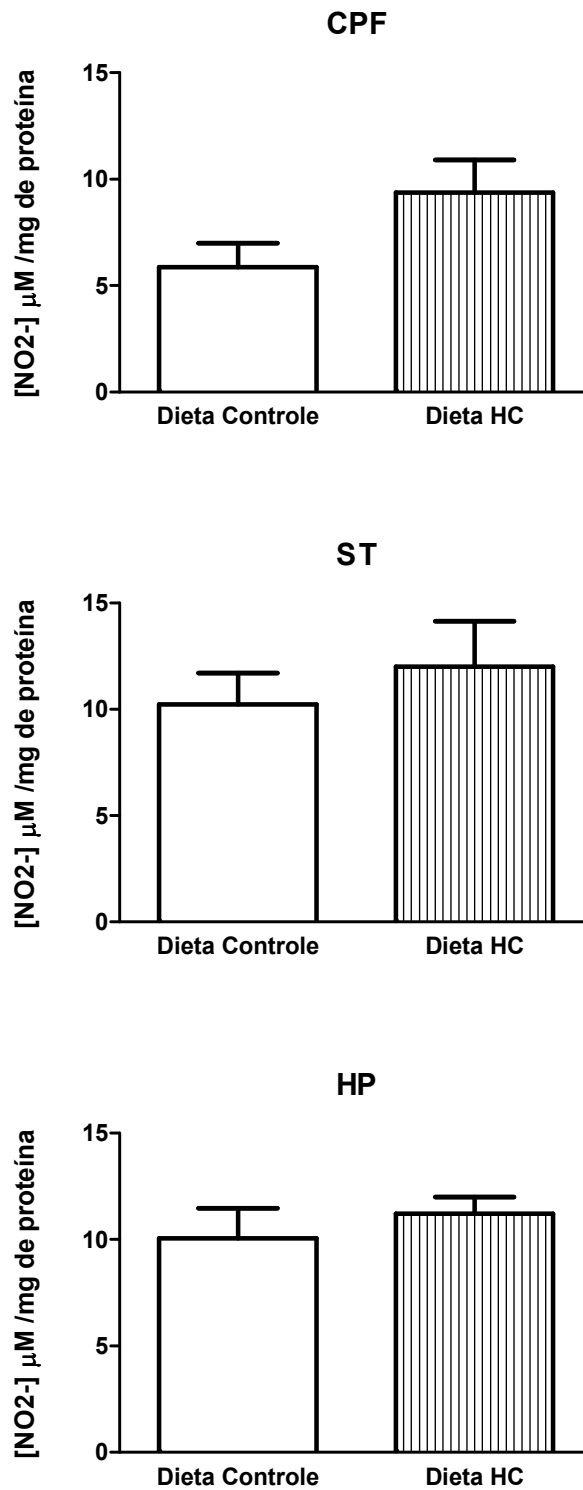
No experimento agudo, não houve diferença na latência para o primeiro episódio de comer entre os grupos tratados com dieta controle e dieta HC por três dias ( $t_{(14)} = 0,255$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student, Figura 19). Semelhante ao experimento crônico, durante cinco minutos após o primeiro episódio de comer, o consumo alimentar do grupo dieta HC foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle ( $t_{(14)} = 5,456$ ,  $p < 0,05$ , Teste t de Student, Figura 20). Além disso, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de nitrito das áreas cerebrais dos animais expostos ao modelo de Hipofagia Induzida pela Novidade (CPF:  $t_{(14)} = 1,831$ ,  $p > 0,05$ . ST:  $t_{(14)} = 0,6954$ ,  $p > 0,05$ ; HP:  $t_{(14)} = 0,6988$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student, Figura 21).



**Figura 19** Efeito do consumo agudo de dieta HC sobre a latência para o primeiro episódio de comer no modelo de Hipofagia Induzida pela Novidade. Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M. do tempo de latência em segundos,  $n=8$ /grupo (Teste t de Student).



**Figura 20** Consumo alimentar após o teste de Hipofagia Induzida pela Novidade após consumo agudo de dieta HC. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do consumo em g,  $n = 8$ /grupo. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Dieta controle,  $n=8$ /grupo (Teste t de Student).

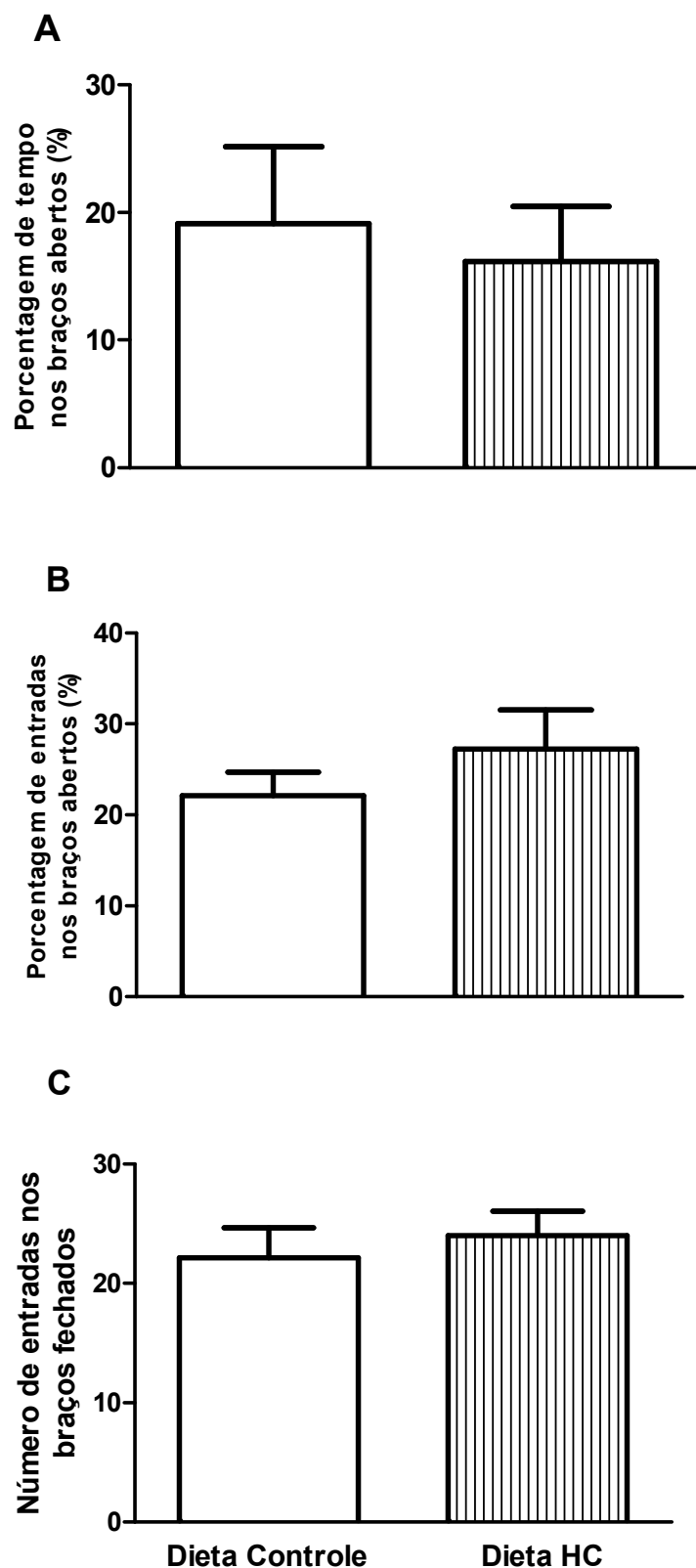


**Figura 21** Níveis de nitrito córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP) de animais submetidos ao consumo agudo de dieta controle ou dieta HC e submetidos ao modelo de Hipofagia Induzida pela Novidade. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. dos níveis de nitrito em  $\mu M$ /mg de proteína,  $n=7$ /grupo (Teste t de Student).

#### 4.2.4 Modelo de Labirinto em Zero Elevado

O consumo crônico de dieta HC não promoveu nenhuma alteração nas respostas comportamentais do LZE, pois não houve alteração na porcentagem de tempo ( $t_{(12)} = 0,3727$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student; Figura 22A) e de entradas ( $t_{(12)} = 1,080$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student, Figura 22B) nos braços abertos quando comparado ao grupo dieta controle. Além disso, o número de entradas nos braços fechados não diferiu significativamente entre os grupos ( $t_{(12)} = 0,5439$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student, Figura 22C).

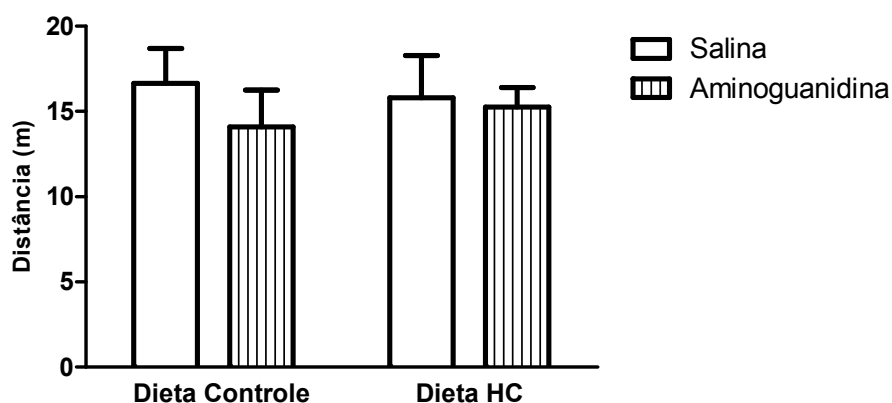




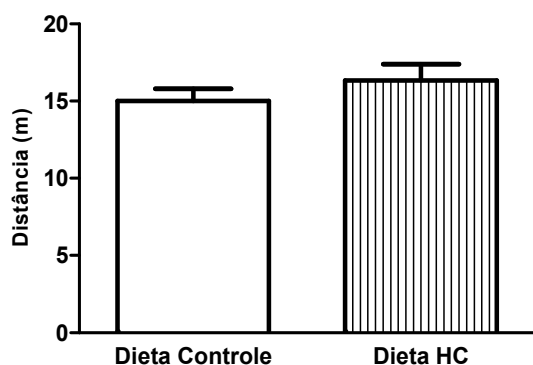
**Figura 22** Efeito do consumo crônico de dieta HC sobre o comportamento de animais submetidos ao LZE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. na porcentagem de tempo gasto (A), na porcentagem de entradas nos braços abertos (B) e no número de entradas nos braços fechados (C).  $n=6-8$ /grupo (Teste t de Student).

#### 4.2.5 Teste de Campo Aberto

Na avaliação da atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto, não houve diferença na distância percorrida entre os grupos dieta controle e o grupo que recebeu dieta HC por 12 semanas. Além disso, o pré-tratamento com aminoguanidina não alterou a locomoção dos animais (efeito dieta  $F_{1,22} = 0,0059$ ;  $p > 0,05$ ; efeito fármaco  $F_{1,22} = 0,5459$ ;  $p > 0,05$ ; efeito de interação fármaco X dieta  $F_{1,22} = 0,2347$ ;  $p > 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni, Figura 23). No tratamento agudo com dieta HC, a distância percorrida no teste de campo aberto não diferiu entre os grupos ( $t_{(13)} = 0,9977$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student, Figura 24).



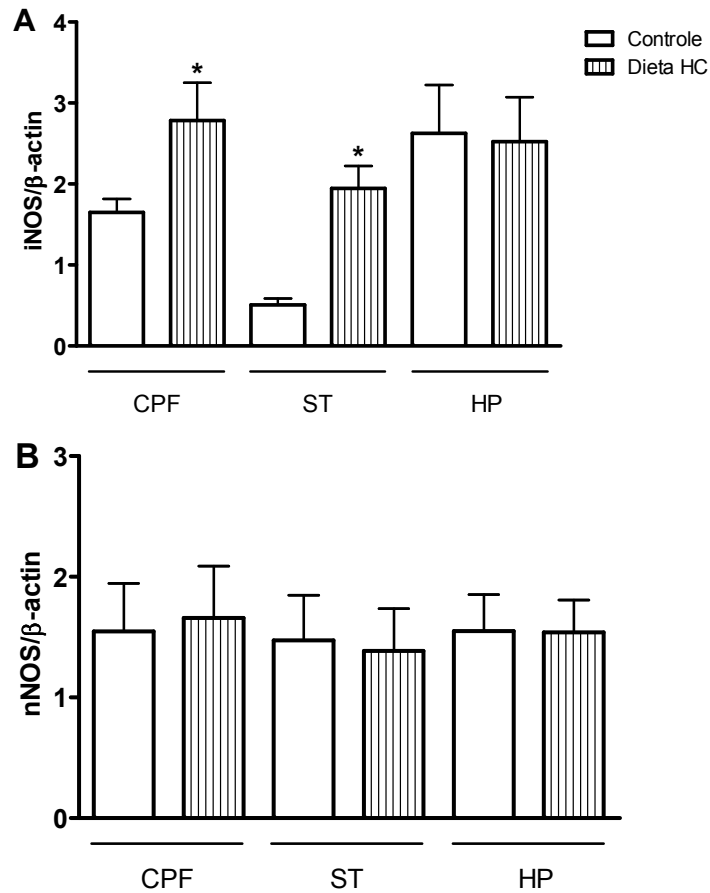
**Figura 23** Efeito da aminoguanidina (50 mg/Kg) sobre a distância percorrida no teste de campo aberto de animais alimentados cronicamente com dieta controle ou dieta HC. Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M. da distância percorrida em m,  $n=6-7$ /grupo (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).



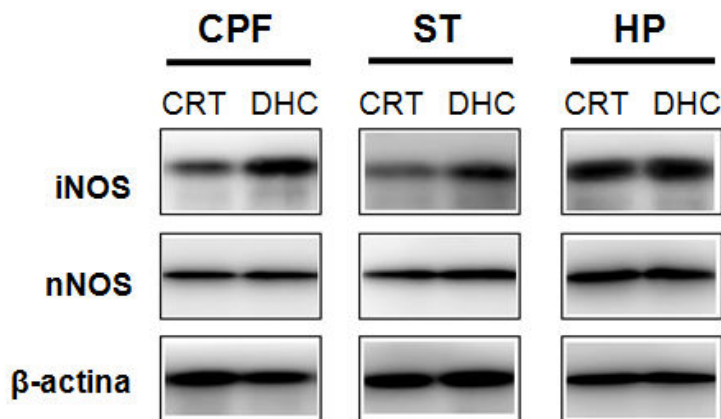
**Figura 24** Efeito do consumo agudo de dieta HC sobre a distância percorrida no teste de campo aberto. Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M. da distância percorrida em m,  $n=7-8$ /grupo (Teste t de Student).

#### 4.4 Expressão de iNOS e nNOS

O consumo crônico de dieta HC levou ao aumento da expressão da proteína iNOS no CPF e ST, mas não no HP (CPF:  $t_{(14)} = 2,293$ ,  $p < 0,05$ ; ST:  $t_{(14)} = 5,034$ ,  $p < 0,05$ ; HP:  $t_{(14)} = 0,1232$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student, Figura 25A). Por outro lado, nenhuma alteração foi observada nos níveis de nNOS em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas (CPF:  $t_{(10)} = 0,1882$ ,  $p > 0,05$ ; ST:  $t_{(10)} = 0,1716$ ,  $p > 0,05$ ; HP:  $t_{(10)} = 0,2997$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student; Figura 25B).



**Figura 25** Efeito do consumo da dieta HC sobre a expressão das proteínas iNOS (A) e nNOS (B) no córtex pré-frontal (CPF), estriado (ST) e hipocampo (HP). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M dos níveis de proteína, \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Dieta controle, iNOS:  $n = 8$ /grupo; nNOS:  $n = 6$ /grupo (Teste t de Student).

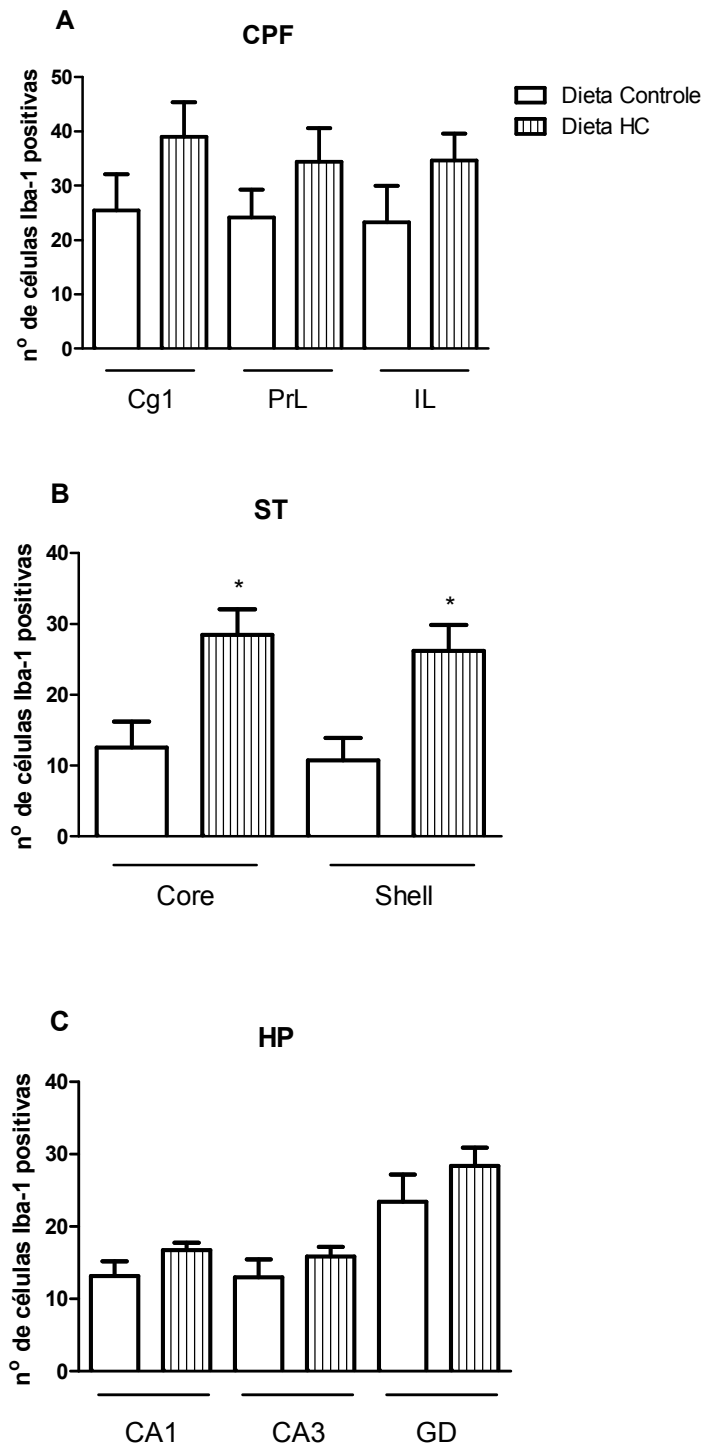


**Figura 26** Fotos representativas das bandas do western blotting (CTR=grupo Dieta controle; DHC=dieta HC; CPF=córtex pré-frontal; ST=estriado; HP=hipocampo).

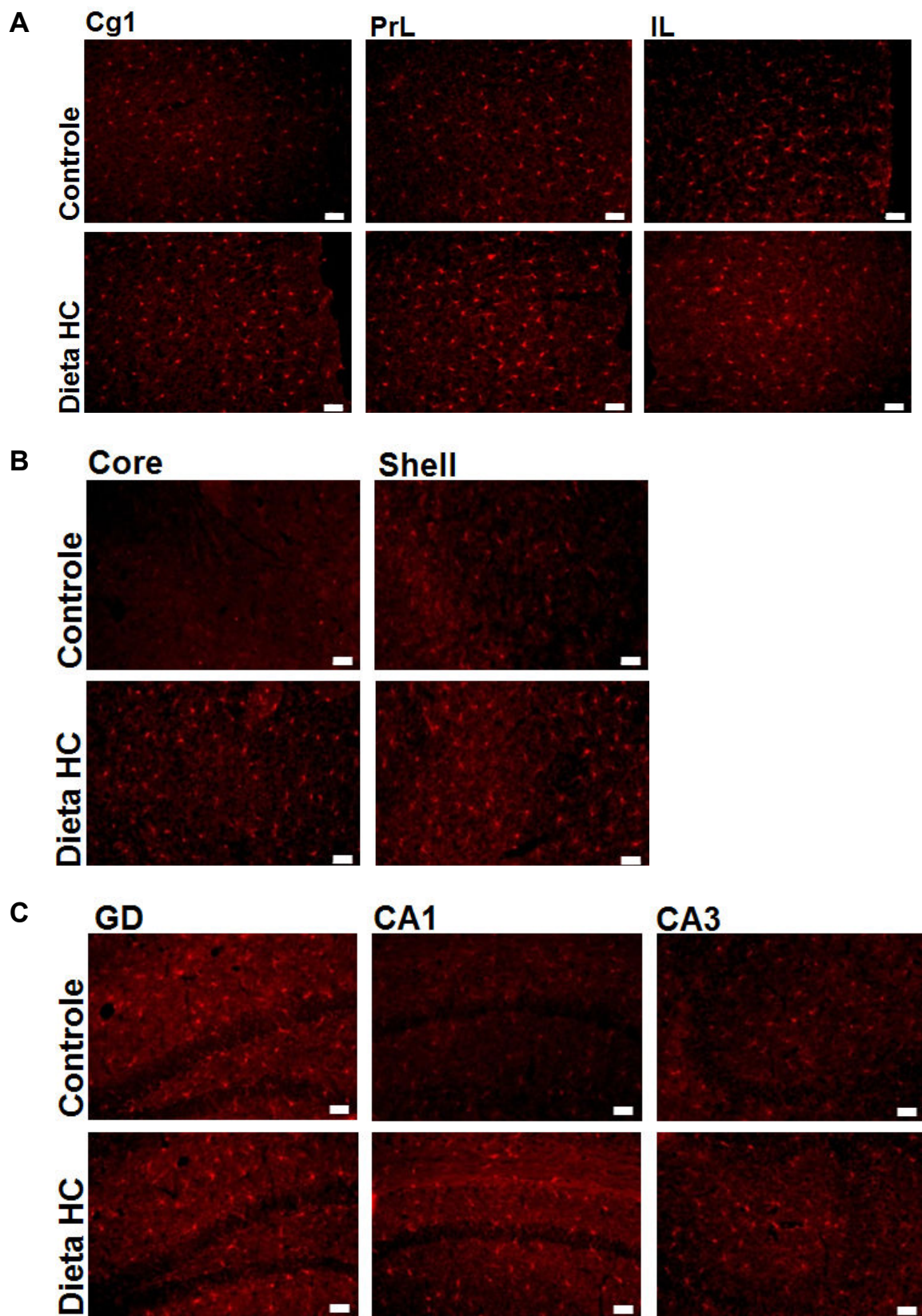
#### 4.5 Avaliação do número e da ativação de células microgliais

Verificou-se um maior número de células Iba-1 positivas após o consumo crônico de dieta HC nas regiões core e shell do ST (Core:  $t_{(15)} = 3,077$ ,  $p < 0,05$ ; Shell:  $t_{(15)} = 3,179$ ,  $p < 0,05$ , Teste t de Student, Figura 27B). Tal efeito não foi observado nas diferentes regiões do CPF [(Cg1:  $t_{(14)} = 1,460$ ,  $p > 0,05$ ; PrL:  $t_{(14)} = 1,271$ ,  $p > 0,05$ ; IF:  $t_{(14)} = 1,405$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student, Figura 27A); e HP (CA1:  $t_{(14)} = 1,488$ ,  $p > 0,05$ ; CA3:  $t_{(14)} = 1,018$ ,  $p > 0,05$ ; GD:  $t_{(14)} = 1,049$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student, Figuras 27C)]

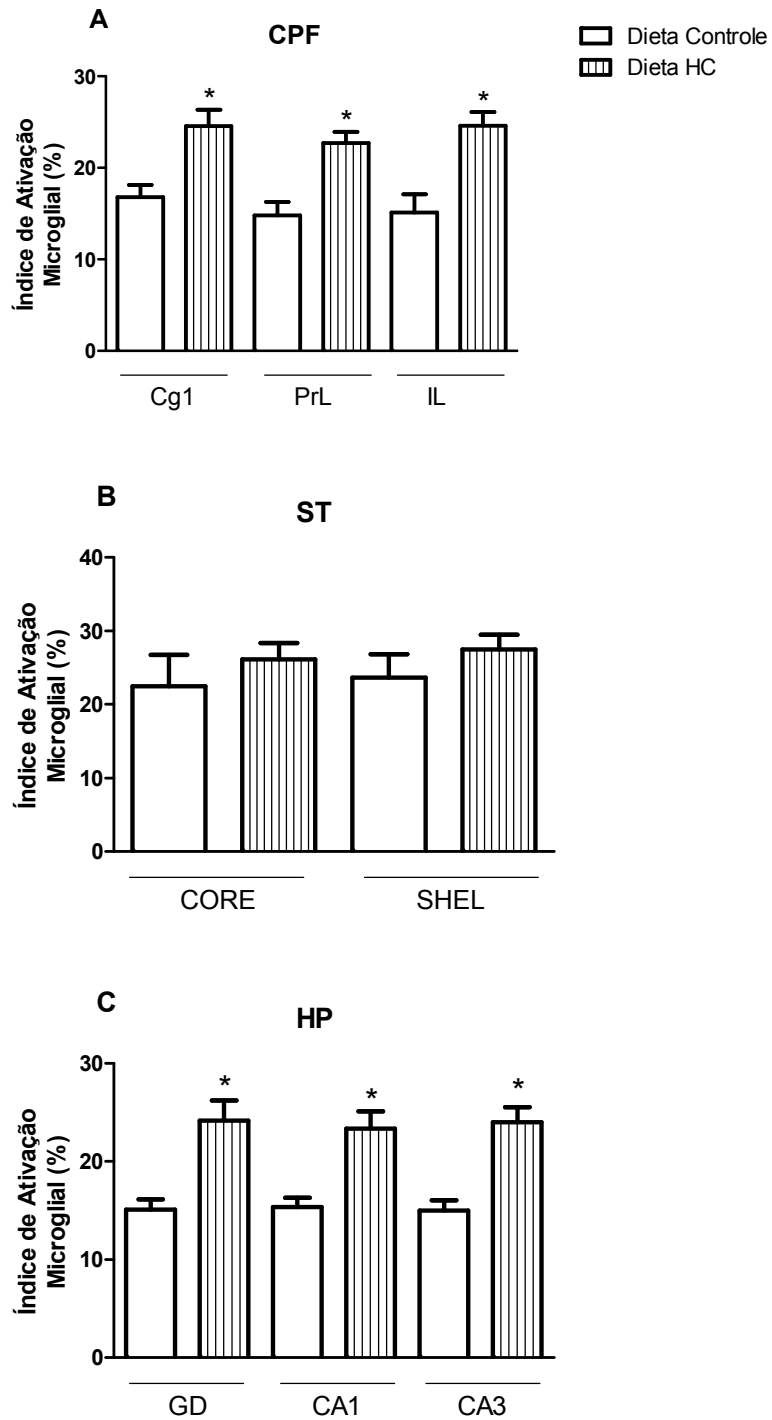
Quanto à avaliação de ativação microglial, os dados revelaram maior número de células ativadas no grupo tratado cronicamente com dieta HC nas regiões Cg1, PL e IL do CPF [CPF (Cg1:  $t_{(6)} = 34,17$ ,  $p < 0,05$ ; PrL:  $t_{(6)} = 4,194$ ,  $p < 0,05$ ; IF:  $t_{(6)} = 3,769$ ,  $p < 0,05$ , Teste t de Student, Figuras 29A) e de GD, CA1 e CA3 do HP (CA1:  $t_{(8)} = 4,008$ ,  $p < 0,05$ ; CA3:  $t_{(8)} = 4,800$ ,  $p < 0,05$ ; GD:  $t_{(8)} = 3,956$ ,  $p < 0,05$ ; Teste t de Student, Figura 29C). Nenhuma diferença foi observada na taxa de ativação microglial nas regiões Core e Shell do ST (Core:  $t_{(6)} = 0,7571$ ,  $p > 0,05$ ; Shell:  $t_{(8)} = 1,012$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student, Figuras 29B).



**Figura 27** Efeito do consumo crônico de dieta HC sobre os níveis de expressão de células Iba-1 positivas no córtex pré-frontal (A), estriado (B) e hipocampo (C). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do número de células, \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Dieta controle,  $n = 7-9$ /grupo (Teste t de Student), CPF = córtex pré-frontal; ST = estriado; HP = hipocampo.

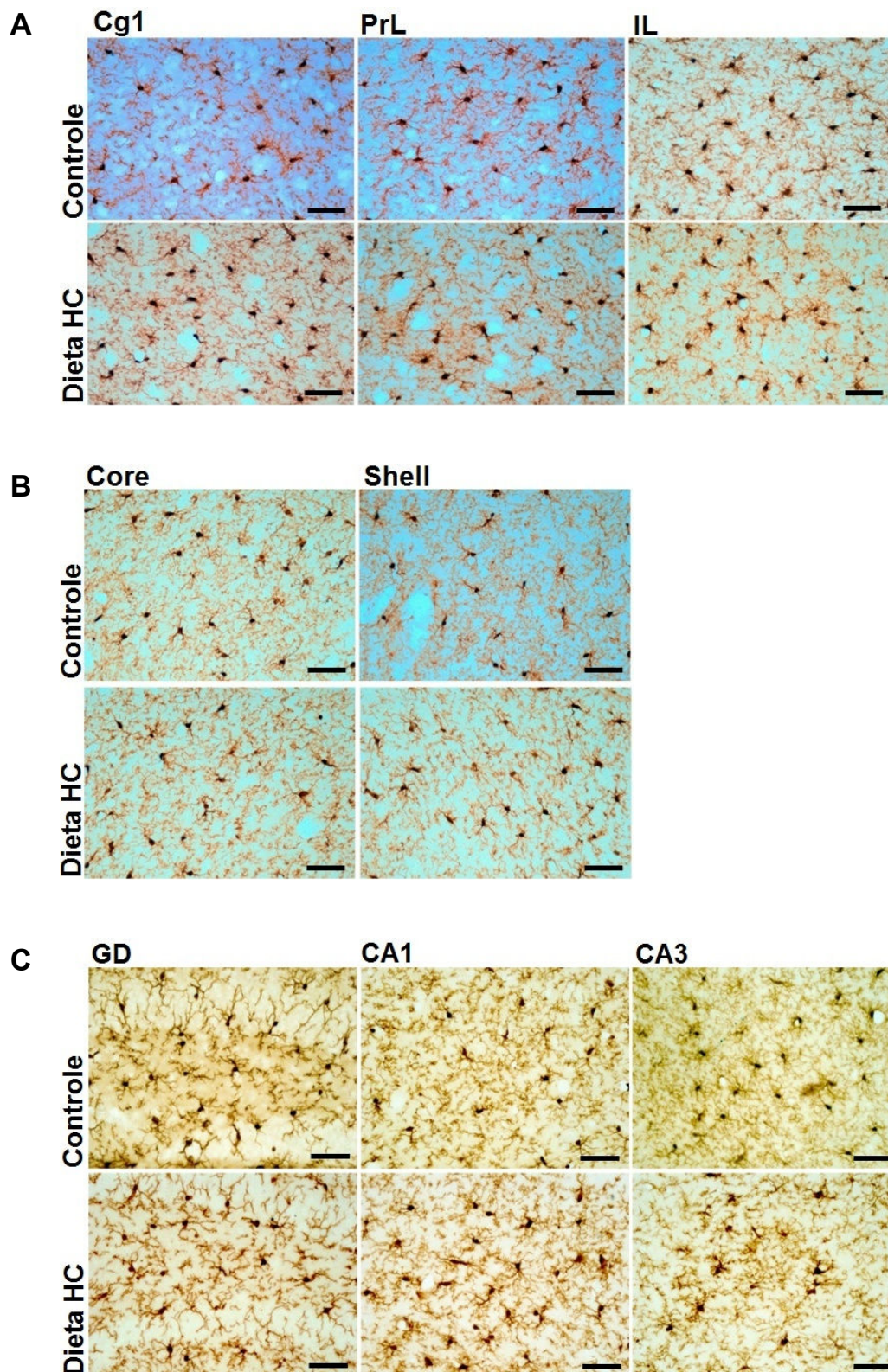


**Figura 28** Fotos representativas de expressão de células Iba-1 positivas no córtex pré-frontal (A), estriado (B) e hipocampo (C) de animais expostos cronicamente à dieta controle ou dieta HC. A barra representa: 100  $\mu$ M. Aumento de 20X.



**Figura 29** Efeito do consumo crônico da dieta HC sobre a ativação de células microgliais no córtex pré-frontal (A), estriado (B) e hipocampo (B). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. da taxa de ativação microglial, \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Dieta controle,  $n = 4-5/\text{grupo}$  (Teste t de Student). CPF = córtex pré-frontal; ST = estriado; HP = hipocampo.



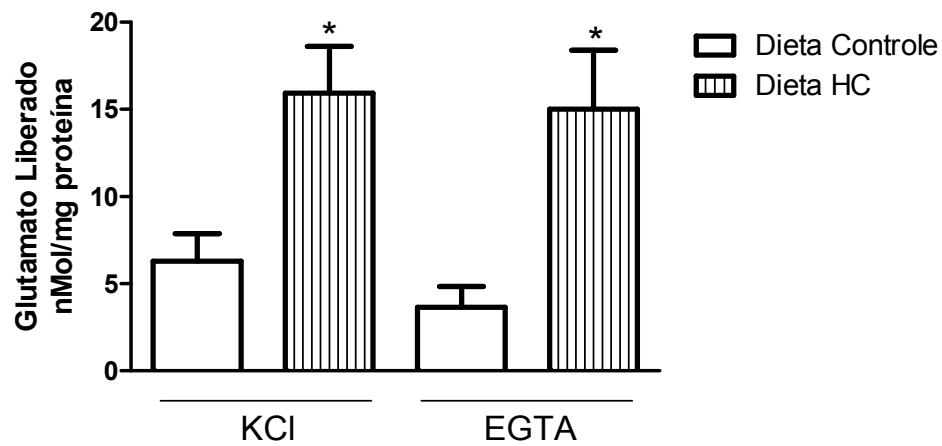


**Figura 30** Fotos representativas do efeito do consumo da dieta HC sobre a ativação de células microgliais no córtex pré-frontal (A), estriado (B) e hipocampo (C). Barra representa: 50  $\mu$ m. Aumento de 40X.

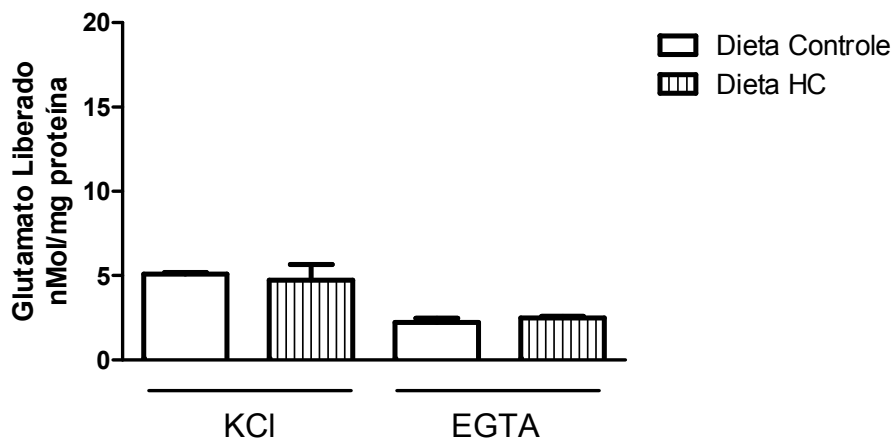
#### 4.6 Liberação de glutamato de sinaptossomas estriatais

Observamos que, nos sinaptossomas estriatais dos animais alimentados cronicamente com a dieta HC, houve um aumento significativo da liberação de glutamato evocado por KCl quando comparado com os animais do grupo dieta controle ( $t_{(7)} = 3,257$ ,  $p < 0,05$ , Teste t de Student, Figura 31). Além disso, a liberação espontânea de glutamato na presença de EGTA foi, da mesma forma, maior no grupo dieta HC em relação ao grupo dieta controle ( $t_{(6)} = 3,160$ ,  $p < 0,05$ , Teste t de Student, Figura 31).

Por outro lado, nos animais tratados agudamente com dieta HC, verificamos que a liberação de glutamato evocada por KCl não difere significativamente do grupo dieta controle ( $t_{(4)} = 0,3929$ ,  $p > 0,05$ , Teste t de Student, Figura 32), assim como não há diferença na liberação de glutamato independente de cálcio extracelular ( $t_{(5)} = 0,8624$ ,  $p < 0,05$ , Teste t de Student, Figura 32).



**Figura 31** Efeito do consumo crônico de dieta HC sobre a liberação de glutamato em sinaptossomas estriatais. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de glutamato liberado em nMol/mg de proteína, \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Dieta controle,  $n = 4-5$ /grupo (Teste t de Student).



**Figura 32** Efeito do consumo agudo de dieta HC sobre a liberação de glutamato em sinaptossomas estriatais. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de glutamato liberado em nMol/mg de proteína,  $n = 3-4$ /grupo (Teste t de Student).

---

## *Discussão*

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que o consumo crônico de dieta HC altera a fase de extinção do condicionamento ao lugar induzido pela cocaína. Além disso, o consumo crônico de dieta HC aumentou o comportamento de enterrar de esferas e levou ao comportamento do tipo ansiogênico no teste de Hipofagia Induzida pela Novidade, porém, esse mesmo efeito não foi observado no LZE. Além disso, o consumo crônico dessa dieta promoveu mudanças importantes na função neuroquímica e neurohistológica que estão, provavelmente, associadas às alterações comportamentais observadas.

Nas últimas décadas, observou-se um aumento expressivo do consumo de açúcar refinado, sendo uma das características da dieta ocidental moderna. Há evidências de que esse aumento está relacionado ao crescimento da prevalência de diabetes tipo 2 e de problemas cardiovasculares (Cordain *et al.*, 2005; Hu, 2010; Maki e Phillips, 2015). Os estudos que avaliam obesidade e comportamento utilizam dietas ricas em lipídios e/ou sacarose para indução de obesidade com consequente aumento de peso. Esses modelos têm em comum ao modelo utilizado nesse estudo, além do aumento da adiposidade, a indução de disfunção metabólica (hiperglicemia, hiperleptinemia e intolerância à glicose) e produção alterada de mediadores inflamatórios (Oliveira *et al.*, 2013; Krishna *et al.*, 2016). O consumo dessas dietas parece resultar em uma série de efeitos desfavoráveis também sobre o SNC, alterando não só comportamentos relacionados ao humor e ansiedade, mas também memória, aprendizagem e resposta a psicoestimulantes (Aslani *et al.*, 2015; Dutheil *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2016; Blanco-Gandia *et al.*, 2017).

O peso dos animais não foi alterado após o consumo de dieta HC, porém, observou-se aumento significativo da deposição lipídica nos experimentos agudo e crônico. Esses dados são confirmados por estudos anteriores que mostram que essa dieta leva ao aumento rápido e persistente da adiposidade em camundongos sem, entretanto, alterar o peso corporal por se tratar de uma dieta isocalórica comparada à dieta controle e não levar ao aumento do consumo (Oliveira *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016). A dieta HC apresenta elevado índice glicêmico, o que resulta em um aumento dos níveis pós-prandiais de insulina e induz o aumento da síntese de enzimas e fatores de transcrição envolvidos na lipogênese e estoque de gordura, favorecendo o aumento da adiposidade (Oliveira *et al.*, 2013). Dessa forma, é importante destacar que, apesar de não aumentar o peso dos animais, como em diversos modelos animais

de obesidade (Sampey *et al.*, 2011), a exposição prolongada a essa dieta é capaz de induzir alterações comportamentais. Além disso, a expansão do tecido adiposo não está diretamente associada às alterações comportamentais avaliadas no presente estudo, uma vez que o consumo agudo, apesar de aumentar a deposição lipídica, não promove mudanças no comportamento. Esses dados sugerem que, provavelmente, a exposição prolongada à dieta HC seja necessária para que mudanças neuroquímicas sejam capazes de resultar em efeitos sobre o comportamento.

Devido ao impacto da expansão do tecido adiposo sobre a saúde física e mental dos indivíduos obesos (Garipey *et al.*, 2010; Wiltink *et al.*, 2013; Donnadiou-Rigole *et al.*, 2016), é de extrema relevância estudos que avaliem a participação de vias celulares e moleculares comuns a esses transtornos para que se possa elaborar estratégias terapêuticas e preventivas mais eficazes. Identificamos, no presente estudo, que o consumo crônico, mas não agudo, de dieta HC leva a uma exacerbação da produção de NO em estruturas cerebrais relacionadas à ansiedade e compulsão, e que a redução da sua produção a partir da inibição da iNOS, mas não da nNOS, foi eficaz em reverter as alterações de comportamento, sugerindo que essa via esteja relacionada às alterações comportamentais induzidas pela dieta HC. Além disso, o consumo crônico de dieta HC resultou em aumento do número ou da ativação de células microgliais nessas estruturas cerebrais, assim como no aumento da liberação estriatal de glutamato.

Primeiro, observamos que o consumo crônico da dieta HC está associado à alteração da resposta à cocaína no teste de CPP. O modelo de preferência condicionada ao lugar baseia-se no componente de recompensa relacionado à aprendizagem associativa e à capacidade cognitiva dos animais de fazer previsões sobre a obtenção de recompensas (Garcia Pardo *et al.*, 2017). Neste estudo, avaliamos o efeito reforçador da cocaína e, após a aquisição da preferência condicionada ao lugar, os animais foram submetidos a um processo de extinção. Esse modelo é uma importante ferramenta utilizada para avaliar os aspectos hedônicos da cocaína (Tzschentke, 2007). É importante ressaltar que não foi observada alteração da atividade locomotora no teste de campo aberto induzido pelo consumo de dieta HC, sugerindo que os resultados obtidos a partir dos testes comportamentais não são decorrentes de efeitos da dieta HC sobre a locomoção.

Baseado no clássico condicionamento Pavloviano, a droga (estímulo incondicionado) é pareada repetidamente com um estímulo neutro (Tzschentke, 1998) e, após pareamentos sucessivos, esse contexto neutro (compartimento pareado com a droga) passa a ser associado com as propriedades recompensadoras da droga e adquire a capacidade de atuar como estímulo condicionado (Bardo e Bevins, 2000). Já

a extinção é definida como uma diminuição na intensidade da resposta aprendida após a remoção do estímulo incondicionado que induziu o reforço (Gass e Chandler, 2013; Garcia Pardo *et al.*, 2017). Funcionalmente, essa fase é observada como uma diminuição na resposta apresentada antes da extinção para níveis mais baixos após o treinamento de extinção (Gass e Chandler, 2013). Nesse estudo, demonstramos que a expressão da preferência ao lugar induzida pela cocaína no grupo dieta HC não foi diferente do grupo controle. No entanto, na fase de extinção, os animais que foram alimentados com dieta HC por 12 semanas apresentaram memória mais persistente da recompensa condicionada. A extinção envolve a geração de uma nova memória para controle do comportamento e diversas vias contribuem para esse processo (Bouton *et al.*, 2006; Knackstedt *et al.*, 2010).

Esse é o primeiro trabalho a avaliar a extinção do condicionamento ao lugar induzido pela cocaína em um modelo de consumo crônico de dieta palatável. Entretanto, trabalhos anteriores verificaram o efeito do consumo de dietas ricas em carboidrato e lipídios sobre a aquisição do condicionamento induzido pela cocaína. Os achados revelam que o consumo crônico de lipídios induz a uma menor resposta aos efeitos reforçadores da cocaína nesse modelo (Thanos *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2012). Por outro lado, corroborando os dados do presente trabalho, alguns trabalhos sugerem que o consumo crônico de sacarose não altera as respostas de condicionamento induzido pela cocaína (Rorabaugh *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Semelhante às drogas de abuso, a ingestão intermitente e excessiva de açúcar cria um estado de dependência, ativa o sistema de recompensa e elevando os níveis de dopamina e opióide na área tegmental ventral e núcleo accumbens (Colantuoni *et al.*, 2002). No nosso estudo, nós não verificamos os mecanismos moleculares envolvidos com as alterações observadas no teste do CPP. Porém, dados da literatura mostram que o consumo de dieta rica em sacarose pode produzir adaptações neurais que contribuem para a sensibilidade comportamental alterada a psicoestimulantes (Avena e Hoebel, 2003; Gosnell, 2005), permitindo a suposição de que o consumo crônico da dieta HC induz alterações no processamento neural do estímulo reforçador, sendo, conseqüentemente, responsável pela alteração no processo de extinção da resposta condicionada induzida pela cocaína.

O comportamento compulsivo é característica tanto do transtorno de abuso de substâncias quanto do transtorno obsessivo-compulsivo (Figue *et al.*, 2016). Assim, a partir dos resultados observados no modelo de CPP, avaliamos o efeito compulsivo da dieta HC no teste de Marble Burying. Verificamos que o consumo crônico de dieta HC, mas não o tratamento agudo com a dieta, aumentou significativamente o comportamento de enterrar esferas. Por outro lado, a exposição crônica à dieta não

modificou as respostas comportamentais no teste do Labirinto em Zero Elevado, sugerindo que o consumo de dieta HC não modifica os comportamentos de ansiedade nesse modelo. Estes resultados corroboram dados anteriores de nosso laboratório que demonstraram que a dieta HC induz efeito ansiogênico no Labirinto em Cruz Elevado somente após situação de estresse (Santos *et al.*, 2016). O Labirinto em Zero Elevado consiste em uma modificação do modelo de Labirinto em Cruz Elevado, não apresentando um compartimento central, apenas braços abertos alternados com braços fechados, o que permite exploração ininterrupta, eliminando qualquer ambiguidade de interpretação associada ao tempo gasto no quadrante central do modelo tradicional (Shepherd *et al.*, 1994).

Em roedores, enterrar objetos inofensivos, como esferas de vidro, faz parte de um repertório natural do comportamento desses animais (Njung'e e Handley, 1991) e alguns estudos mostram que o teste do Marble Burying parece refletir um comportamento repetitivo e perseverante mais do que a ansiedade induzida pela novidade (Thomas *et al.*, 2009). De fato, diversas evidências questionam esse teste como um modelo experimental de ansiedade em roedores, pois, diferentemente da maioria dos testes de ansiedade que são baseados no comportamento exploratório, a exposição repetida a essas esferas não causa habituação comportamental (Thomas *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2011). Adicionalmente, o teste do Marble Burying é freqüentemente usado para pesquisar o efeito anti-compulsivo de drogas e simula alguns aspectos do comportamento obsessivo-compulsivo em humanos, como os movimentos repetitivos (compulsões) (Umathe *et al.*, 2009). Uma vez que a dieta HC aumenta o comportamento de enterrar esferas, mas não induz comportamento semelhante à ansiedade no Labirinto em Zero Elevado, é possível inferir um efeito tipo-compulsivo induzido pela dieta HC no teste de Marble Burying. Além disso, a alteração da resposta de extinção no modelo de CPP induzido pela cocaína associada ao aumento do comportamento de Marble Burying sustentam a hipótese do efeito tipo-compulsivo em decorrência da ingestão crônica de dieta HC.

Em concordância com dados prévios do nosso laboratório, verificamos que a ingestão crônica da dieta HC altera comportamentos relacionados à ansiedade após situações de estresse (Santos *et al.*, 2016). Esse efeito do tipo ansiogênico foi evidenciado pela maior latência para comer quando os animais são expostos a um novo ambiente após um período de privação alimentar. O modelo de Hipofagia Induzida pela Novidade é preditivo de ansiedade, uma vez que a administração de diferentes drogas com efeito ansiolítico diminui a latência para comer (Bodnoff *et al.*, 1988). A diferença observada entre os grupos alimentados com dieta HC e dieta controle na quantidade de ingestão alimentar nos cinco minutos subsequentes ao teste



não mostrou correlação com o comportamento observado para nenhum dos grupos. Dessa forma, pode-se inferir que essa diferença, provavelmente, é resultado da textura distinta das dietas utilizadas.

Corroborando nossos dados, indivíduos com peso corporal normal, mas com níveis aumentados de gordura corporal, apresentam níveis aumentados de cortisol, sugerindo uma maior vulnerabilidade ao estresse associado a um prejuízo no desempenho cognitivo (Mujica-Parodi *et al.*, 2009). Além disso, pessoas obesas são, mais responsivas ao estresse (Brydon, 2011) e, conseqüentemente, apresentam maior suscetibilidade para desenvolver distúrbios relacionados ao humor (Garipey *et al.*, 2010; Wiltink *et al.*, 2013). Em roedores, observa-se que, após consumo crônico de dieta hiperlipídica, os animais apresentam resposta exagerada ao estresse de injeção intraperitoneal de solução salina, além de liberação aumentada de corticosterona (Legendre e Harris, 2006).

O mecanismo biológico que liga a expansão do tecido adiposo e reatividade ao estresse é pouco compreendido, porém, as evidências apontam que a inflamação pode ser um fator importante na relação entre a obesidade e os transtornos de humor. Esta sugestão baseia-se na observação de que a inflamação crônica de baixo grau está implicada na fisiopatologia tanto dos transtornos de humor quanto da obesidade (Gondim *et al.*, 2015; Reus, Fries, *et al.*, 2015). O processo inflamatório está associado a danos celulares e conseqüente injúria cerebral nos transtornos psiquiátricos (Najjar *et al.*, 2014; Reus, Fries, *et al.*, 2015; Yuste *et al.*, 2015), além de alterações na neurotransmissão e prejuízo da neurogênese (Kitagami *et al.*, 2003; Frenois *et al.*, 2007; Kuzumaki *et al.*, 2010). Na obesidade, o processo inflamatório parece ser desencadeado predominantemente pelo tecido adiposo branco (Canello e Clement, 2006). Esse tecido possui papel endócrino reconhecido por sua função de sintetizar e liberar adipocinas, como a leptina, e citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ . Pacientes obesos apresentam níveis circulantes aumentados desses mediadores o que, provavelmente, está associado a alterações metabólicas, como resistência à insulina e problemas cardiovasculares (Luft *et al.*, 2013; Gondim *et al.*, 2015), além de sintomas de ansiedade e depressão (Wiltink *et al.*, 2013; Hiles *et al.*, 2016). Estudos prévios demonstram que a dieta HC induz uma produção alterada de mediadores inflamatórios, sugerindo um efeito inflamatório da ingestão de dieta HC (Ferreira, Mário *et al.*, 2011; Oliveira, Menezes-Garcia *et al.*, 2013).

Durante o processo inflamatório, observa-se, ainda, aumento da expressão da enzima iNOS e conseqüente exacerbação da síntese de NO (Hartlage-Rubsamen *et al.*, 1999; Madrigal *et al.*, 2002). Em indivíduos obesos, assim como em modelos animais de obesidade, observam-se níveis plasmáticos aumentados dos produtos do

metabolismo do NO (nitrito/nitrato), sugerindo um aumento da produção desse mediador na obesidade (Ghasemi *et al.*, 2013; Stanimirovic *et al.*, 2016). Além disso, em animais obesos observa-se aumento da expressão da iNOS em vários órgãos, como fígado, rim, e, no SNC, no hipotálamo (Morley *et al.*, 1995; Fujimoto *et al.*, 2005; Sherif, 2014). O NO é sintetizado a partir de L-arginina por três isoformas das enzimas óxido nítrico sintase, nNOS, iNOS e eNOS, que diferem pela dependência de cálcio para ativação e pela região onde são expressas (Andrew e Mayer, 1999).

Conhecendo sobre o papel do NO não apenas nas respostas de ansiedade, mas também nos comportamentos tipo obsessivo-compulsivos (Guimaraes, Bejjamini *et al.*, 2005, Umathe, Bhutada *et al.*, 2009, Krass, Runkorg *et al.* 2010, Montezuma, Biojone *et al.* 2012), avaliamos a participação da via nitrérgica nas mudanças comportamentais induzidas pela dieta HC nos modelos de Marble Burying e Hipofagia Induzida pela Novidade. Observamos que o pré-tratamento com aminoguanidina, um inibidor preferencial de iNOS, resultou em um menor número de esferas enterradas e em uma menor latência para comer. Esses dados foram acompanhados por alterações nos níveis de nitrito nas estruturas cerebrais avaliadas. Os animais tratados cronicamente com a dieta HC apresentaram maior formação de nitrito no córtex pré-frontal e núcleo estriado, quando submetidos ao teste do Marble Burying, e no pré-frontal, núcleo estriado e hipocampo, quando submetidos ao teste de Hipofagia Induzida pela Novidade. Confirmando os dados obtidos nos testes comportamentais, o pré-tratamento com aminoguanidina também reverteu o aumento de nitrito no núcleo estriado em ambos os modelos avaliados, sugerindo um papel importante do NO na modulação das respostas comportamentais induzidas pela dieta HC. Além disso, o consumo agudo de dieta HC não induziu alterações nas respostas comportamentais e não induziu alterações nos níveis de nitrito após 3 dias de ingestão de dieta HC.

Estudos anteriores corroboram nossos resultados indicando que o NO é importante na regulação de comportamentos relacionados à compulsão e ansiedade, uma vez que a administração de inibidores da NOS resulta em efeito anti-compulsivo (Umathe *et al.*, 2009; Krass *et al.*, 2010) e ansiolítico em diferentes modelos de ansiedade (Amiri *et al.*, 2015; Lisboa *et al.*, 2015). Ainda, em estudos referentes ao potencial ansiogênico do NO, observa-se que a exacerbação da síntese de NO no córtex pré-frontal e hipocampo está associada à maior susceptibilidade ao estresse e comportamentos relacionados à ansiedade em roedores (Amiri *et al.*, 2015). Além disso, após situações de estresse, verifica-se maior ativação de neurônios contendo NOS em áreas cerebrais relacionadas às reações defensivas e de ansiedade (Bejjamini e Guimaraes, 2006a; b; Sivanathan *et al.*, 2015). Interessantemente, um estudo publicado recentemente mostrou que o diabetes experimental induzido pela

estreptozotocina promove desregulação da produção de NO e que esse, por sua vez, contribui para o comportamento tipo-ansiosgênico nesses animais (Siba *et al.*, 2017).

Para investigar a fonte de NO, avaliamos os níveis de proteínas iNOS e nNOS. A síntese de iNOS é aumentada por estímulo inflamatório e, além disso, várias evidências apontam para o papel patogênico dessa enzima em distúrbios neuropsiquiátricos (Coleman, 2001; Rao, Harry *et al.*, 2010; Montezuma, Biojone *et al.*, 2012). Observamos, nesse estudo, que a dieta HC aumentou os níveis de iNOS no córtex pré-frontal em comparação ao grupo dieta controle, mas não houve diferença nos níveis de nNOS, indicando que a exacerbação da produção de NO provavelmente deve-se ao aumento da síntese da isoforma induzível da NOS. Além disso, no experimento de Marble Burying, o n-propil, um inibidor seletivo de nNOS, em doses equipotentes à inibição de nNOS pela aminoguanidina, não resultou em alterações do comportamento, sustentando a hipótese de que o efeito da dieta sobre o comportamento é decorrente de um aumento dos níveis de nitrito proveniente da iNOS e não da nNOS.

A nNOS é conhecida por estar constitutivamente expressa, porém, eventos aversivos podem levar ao aumento da sua expressão em estruturas cerebrais relacionadas às reações de defesa (Vila-Verde *et al.*, 2016). Além disso, o LPS aumenta a expressão de nNOS em modelos *in vivo* e *in vitro* (Di Girolamo *et al.*, 2003; Espanol *et al.*, 2014). No nosso estudo, entretanto, a expressão de nNOS não mostrou-se alterada após o consumo de dieta HC e a inibição seletiva dessa enzima pelo n-propil não reverteu o comportamento de enterrar esferas, evidenciando que, nesse modelo, a nNOS parece não participar do efeito da dieta HC sobre o comportamento. Porém, não se pode excluir o possível envolvimento dessa enzima nas alterações comportamentais observadas nesse estudo, uma vez que não quantificamos sua forma fosforilada. A desfosforilação da nNOS aumenta sua atividade enzimática, levando ao aumento da produção de NO (Rameau *et al.*, 2003). Observa-se que a nNOS está constitutivamente fosforilada e que a ativação do receptor de NMDA de glutamato, por exemplo, diminui o nível de fosforilação dessa enzima, ativando-a (Rameau *et al.*, 2003). Assim, nesse modelo, é possível que, apesar da expressão total da nNOS não estar alterada, sua fosforilação e consequente ativação estejam modificadas pelo consumo crônico da dieta HC.

Conforme discutido anteriormente, a inflamação crônica é uma característica fundamental da obesidade e há evidências consistentes, a partir de animais tratados cronicamente com dietas hiperlipídicas, da ocorrência de processo inflamatório em áreas cerebrais que regulam o humor (Dutheil *et al.*, 2016; Vinuesa *et al.*, 2016). Estudos anteriores verificaram níveis aumentados de IL-6 e TNF- $\alpha$  nos tecidos

adiposos e intestinal e TNF- $\alpha$  no tecido hepático em animais cronicamente alimentados com dieta HC (Ferreira *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013; De Oliveira *et al.*, 2015). É possível que, nesse modelo, essas citocinas pró-inflamatórias interfiram no funcionamento de estruturas cerebrais relacionadas à ansiedade, contribuindo para as alterações comportamentais induzidas pela dieta HC. São várias as vias possivelmente envolvidas nas mudanças de comportamento induzidas por esses mediadores inflamatórios, incluindo a hiperativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o consequente aumento dos níveis circulantes de corticosterona, o que poderia justificar comportamento tipo-depressivo e maior susceptibilidade ao estresse (Pace e Miller, 2009; Santos *et al.*, 2016). De fato, em animais alimentados cronicamente com dieta hiperlipídica, observa-se aumento não só dos níveis circulantes de corticosterona, mas também da síntese desse hormônio no parênquima cerebral (Dutheil *et al.*, 2016). É discutido, ainda, que as citocinas interferem no metabolismo e função de vários neurotransmissores, além da plasticidade neuronal, o que também pode contribuir para as alterações de comportamento observadas (Andre *et al.*, 2014; Vinuesa *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016).

Nesse sentido, estudos apontam para uma íntima relação entre neuroinflamação e ativação microglial (Yuste *et al.*, 2015). De fato, o consumo de dietas palatáveis ricas em lipídios, que também induz um estado inflamatório, aumenta o número total de células microgliais nas regiões cerebrais relacionadas à ansiedade, comportamentos depressivos e funções cognitivas, como o hipotálamo, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo (Gao *et al.*, 2014, Bocarsly *et al.*, 2015, Vinuesa *et al.*, 2016, White *et al.*, 2016). Neste trabalho, verificamos que o consumo crônico de dieta HC leva a alterações nas células microgliais, revelando um maior número dessas células no núcleo estriado. Por outro lado, observamos maior taxa de ativação microglial no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais cronicamente alimentados com dieta HC.

É importante ressaltar, que o processo de ativação microglial é acompanhado da alteração na morfologia dessas células (Kreutzberg, 1996). Assim, as células dos animais controles são mais ramificadas e com ramos mais longos no córtex pré-frontal e hipocampo, quando comparadas às células dos animais cronicamente alimentados com dieta HC, que são menos ramificadas e com ramos mais curtos (Hovens *et al.*, 2014). Como resultado, a relação entre área do corpo e a área da célula, ou seja, o índice de ativação microglial, é maior nos animais dieta HC no córtex pré-frontal e hipocampo (Hovens *et al.*, 2014). O aumento do número total de células microgliais no ST pode ser decorrente da maior proliferação dessas células nessa região. Além disso, baseado em estudos anteriores que avaliaram o efeito de dieta hiperlipídica,

esse efeito pode ser consequência da migração de células microgliciais de outras regiões cerebrais ou, ainda, da infiltração de monócitos da periferia (Nelson *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2014). Gao *et al.* (2014) mostrou que o consumo crônico de dieta rica em lipídios não alterou a proliferação celular no hipotálamo, onde o número total de células microgliciais sofreu incremento significativo, sugerindo a migração dessas células para essa região.

De acordo com as evidências acima mencionadas, propomos que a dieta HC leva à ativação ou recrutamento de células microgliciais, o que, por sua vez, aumenta a síntese de iNOS e, conseqüentemente, resulta em exacerbação da síntese de NO. Com base nas avaliações comportamentais, a inibição da iNOS e a redução da síntese de NO reverteram a alteração comportamental induzida pela dieta HC, sugerindo que esta cascata de eventos contribui para as alterações de comportamento induzidas pelo consumo crônico de dieta HC.

Nossos resultados mostram que animais cronicamente tratados com dieta HC apresentaram maior ativação microglial ou maior número de células Iba-1-positivas acompanhado do aumento da síntese de iNOS e da produção de NO no córtex pré-frontal e núcleo estriado. Curiosamente, a região hipocampal não apresenta alterações dos níveis de iNOS e NO, porém, paradoxalmente, exibe ativação das células microgliciais em análise histológica dessa região. Entretanto, esperava-se um aumento de iNOS e NO no hipocampo, uma vez que se observou ativação de células microgliciais nessa região. Essa estrutura, juntamente com o córtex pré-frontal, constitui em um componente chave do substratoneural de respostas de ansiedade e processos de aprendizagem e memória (Ongur e Price, 2000; Barker e Warburton, 2015; Calhoon e Tye, 2015; Zarrindast e Khakpai, 2015; Jimura *et al.*, 2017). O hipocampo é composto por distintas regiões, hipocampo dorsal e ventral em roedores, correspondentes ao hipocampo posterior e anterior, respectivamente, em primatas (Fanselow e Dong, 2010). Propõe-se que essas regiões apresentem funções distintas. Por exemplo, está bem estabelecido que o hipocampo dorsal desempenha papel essencial no processo cognitivo de aprendizagem e memória (Pothuizen *et al.*, 2004; Fanselow e Dong, 2010). Já o hipocampo ventral parece modular processos afetivos e relacionados à emoção (Maren e Holt, 2004; Fanselow e Dong, 2010). Dessa forma, o método para dissecação utilizado nesse trabalho não discriminou entre as regiões ventral e dorsal, sendo possível que a avaliação apenas da região ventral do hipocampo poderia evidenciar diferença dos níveis de iNOS e NO nesse trabalho, uma vez que essa região está envolvida na modulação dos comportamentos avaliados. Além disso, sabe-se que situações de estresse são capazes de elevar os níveis hipocampais de iNOS, levando ao aumento subsequente de NO (Filipovic *et al.*, 2017;

Hueston *et al.*, 2017) o que pode explicar o aumento da síntese de NO no hipocampo apenas no modelo de Hipofagia Induzida pela Novidade, onde os animais foram expostos ao estresse de privação alimentar. Nessa situação de estresse, possivelmente a síntese de NO foi mais expressiva em toda a estrutura hipocampal, sendo possível observar diferença significativa entre os grupos.

O núcleo estriado também compõe a rede neural dos comportamentos relacionados à ansiedade, além do sistema cerebral de recompensa. O núcleo accumbens, localizado na porção ventral do núcleo estriado, é morfologicamente dividido em regiões Core e Shell (Meredith *et al.*, 2008). Essa porção do núcleo estriado recebe suas principais aferências excitatórias (glutamatérgicas) de estruturas límbicas como o córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo (Cardinal *et al.*, 2002; Cerovic *et al.*, 2013). Além disso, neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral projetam-se para o núcleo accumbens, compondo uma importante via de regulação dos comportamentos associados à recompensa (Meredith *et al.*, 2008). A compulsividade no transtorno obsessivo-compulsivo e na adicção está relacionada com a ativação do núcleo estriado ventral (Figuee *et al.*, 2016). Além disso, o núcleo estriado recebe informações da amígdala e córtex pré-frontal durante a exposição a uma situação ameaçadora e sugere-se seu papel durante a fase de avaliação de risco (Calhoon e Tye, 2015). Um estudo realizado em humanos mostrou que o núcleo estriado ventral é ativado durante o condicionamento contextual aversivo (Pohlack *et al.*, 2012; Calhoon e Tye, 2015). Em modelos animais, as evidências apontam para um papel do núcleo estriado no aprendizado aversivo (Darvas *et al.*, 2011). Quanto à avaliação dessa estrutura em modelos animais de obesidade, há poucos dados, porém, há evidências de maior ativação dessa região em camundongos expostos cronicamente a uma dieta hiperlipídica (Sharma e Fulton, 2013). Dessa forma, tais evidências confirmam que as alterações estriatais observadas nesse estudo podem mediar as respostas comportamentais induzidas pelo consumo de dieta HC.

O NO interfere no comportamento por uma série de mecanismos, dentre eles, a neurotransmissão glutamatérgica (Wang *et al.*, 2005; Calabrese *et al.*, 2007; Mallozzi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013). O glutamato, considerado o principal neurotransmissor excitatório no SNC (Fonnum 1984, Miladinovic, Nashed *et al.*, 2015), sob condições normais, é liberado na fenda sináptica e é encontrado, em grande parte, no meio intracelular, e relativamente em menor quantidade no ambiente extracelular (Fonnum, 1984). O NO promove aumento de neurotransmissão glutamatérgica por diferentes mecanismos. Trabace e Kendrick (2000) mostraram que a infusão de um doador de NO no estriado de ratos induz ao aumento de glutamato nessa região por vias dependentes e não-dependentes de GMPc (Trabace e Kendrick, 2000). Ainda,

mostrou-se que o aumento da iNOS e o conseqüente aumento da produção de NO estão relacionados com o aumento dos níveis de glutamato no cérebro e com comportamento relacionado à ansiedade (Wang *et al.*, 2013).

Estudos indicam claramente uma desregulação glutamatérgica em certas condições psiquiátricas, como depressão, ansiedade e também no transtorno obsessivo-compulsivo e adicção, demonstrando neurotransmissão glutamatérgica aumentada em regiões específicas do cérebro (Levine *et al.*, 2000; Chakrabarty *et al.*, 2005; Strawn *et al.*, 2013; Marquez *et al.*, 2016). A desregulação da neurotransmissão glutamatérgica pode estar envolvida nos mecanismos neurobiológicos subjacentes aos transtornos psiquiátricos, como esquizofrenia, ansiedade e depressão, e a processos neurodegenerativos, como epilepsia (Miladinovic *et al.*, 2015).

No experimento de liberação de glutamato, a despolarização dos sinaptossomas por KCl produz diferentes componentes de liberação desse neurotransmissor distinguidos por dependência ou não de cálcio extracelular (Nicholls *et al.*, 1987; Vieira *et al.*, 2003). Nossos resultados indicam que a liberação de glutamato no ST está aumentada em animais que foram cronicamente alimentados com dieta HC independentemente dos níveis extracelulares de cálcio. O aumento significativo da liberação de glutamato de sinaptossomas estriatais coincide com a exacerbação da síntese de iNOS, com a maior produção de NO e com as alterações comportamentais em animais que receberam dieta HC por 12 semanas. Curiosamente, corroborando tais achados, a ingestão aguda de dieta HC não alterou as respostas comportamentais, além de não ter levado à exacerbação da produção de NO ou da liberação de glutamato, sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica alterada pode estar relacionada com as alterações comportamentais observadas em animais tratados por 12 semanas com HC dieta.

Não há dados na literatura relacionando o efeito do consumo de dietas ricas em carboidrato sobre a neurotransmissão glutamatérgica. Dessa forma, nossos resultados mostram, pela primeira vez, que o consumo crônico de uma dieta rica em carboidrato está associado ao aumento da liberação desse neurotransmissor a partir de sinaptossomas estriatais. Por outro lado, há evidências de que as alterações cerebrais promovidas pelo consumo de dieta hiperlipídica induza efeitos deletérios em vias neurais glutamatérgicas, embora haja algumas inconsistências. Tais estudos demonstraram que o consumo de dietas palatáveis e hipercalóricas resulta em redução da neurotransmissão glutamatérgica, evidenciado, por exemplo, por menor conteúdo desse neurotransmissor no hipocampo (Auer *et al.*, 2015) e pelo aumento da recaptção de glutamato nessa mesma estrutura (Valladolid-Acebes *et al.*, 2012).

Porém, há dados que sugerem aumento dos níveis cerebrais de glutamato após consumo crônico de dieta rica em lipídios (Lee *et al.*, 2010).

Nossos resultados sugerem um aumento da neurotransmissão glutamatérgica em animais submetidos ao consumo crônico, mas não agudo, de dieta HC. Entretanto, o experimento utilizado para tal inferência não nos permite concluir sobre o conteúdo de glutamato ou sobre a eficiência da transmissão sináptica glutamatérgica na estrutura avaliada. Porém, tais dados são fortes evidências que propõem a possível participação dessa via nas alterações comportamentais observadas nos animais submetidos ao consumo crônico da dieta HC, embora estudos posteriores sejam necessários para confirmação de tal hipótese. Além disso, os dados referentes à liberação de glutamato a partir de sinaptossomas estriatais reforçam, mais uma vez, que a exposição prolongada à dieta HC é necessária para que as alterações neuroquímicas avaliadas pelo presente estudo sejam evidenciadas e, portanto, promovam as alterações comportamentais.

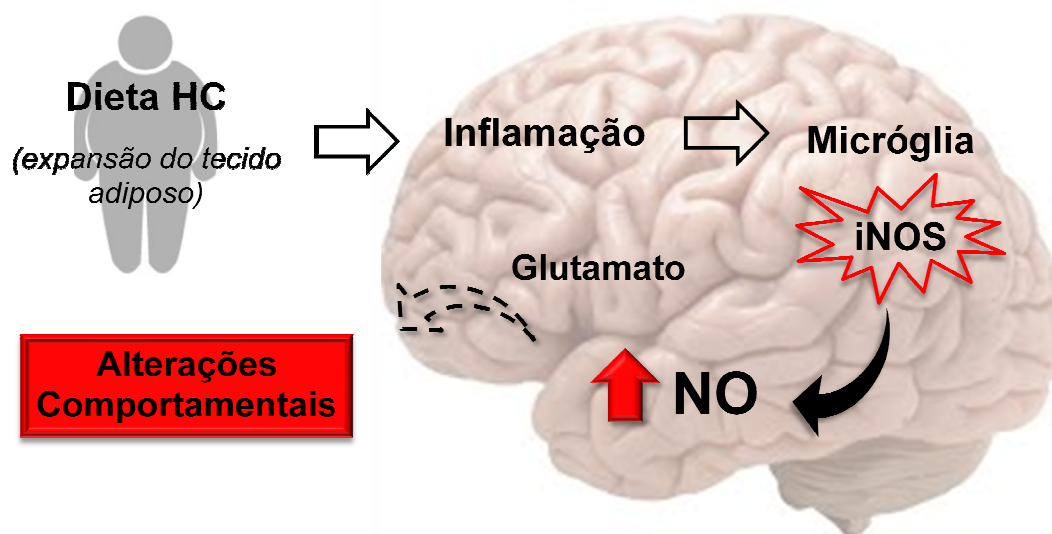


---

*Conclusão*

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo sugere que o consumo crônico de dieta HC induz efeitos tipo-ansio gênico, após situação de estresse, e tipo-compulsivo possivelmente relacionados à via do NO. Além disso, o comportamento relacionado à ansiedade frente a eventos estressantes sugere uma maior susceptibilidade ao estresse em animais cronicamente alimentados com dieta HC. Os resultados indicam, ainda, que as células microgliais ativadas possivelmente aumentam a expressão de iNOS, resultando em exacerbação da produção de NO e subsequente aumento da liberação de glutamato. Com base nesses achados, inferimos que esses eventos estejam relacionados com as alterações de comportamento observadas nos animais cronicamente submetidos à dieta HC.



**Figura 33** Modelo proposto para os efeitos no SNC em decorrência do consumo crônico de dieta HC.

---

*Referências Bibliográficas*

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, J.; JOHNSON, R. W. Central inhibition of interleukin-1beta ameliorates sickness behavior in aged mice. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 3, p. 396-401, Mar 2009.

ADAMS, V. et al. Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1beta and NFkappaB activation: an in vitro and in vivo study. **Cardiovasc Res**, v. 54, n. 1, p. 95-104, Apr 2002.

ADINOFF, B. Neurobiologic processes in drug reward and addiction. **Harv Rev Psychiatry**, v. 12, n. 6, p. 305-20, Nov-Dec 2004.

AGUILAR-VALLES, A. et al. Obesity, adipokines and neuroinflammation. **Neuropharmacology**, v. 96, n. Pt A, p. 124-34, Sep 2015.

ALMEIDA-SANTOS, A. F. et al. The antipsychotic aripiprazole selectively prevents the stimulant and rewarding effects of morphine in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 742, p. 139-44, Nov 05 2014.

ALMEIDA-SUHETT, C. P. et al. Behavioral changes in male mice fed a high-fat diet are associated with IL-1beta expression in specific brain regions. **Physiol Behav**, v. 169, p. 130-140, Feb 01 2017.

AMIRI, S. et al. Co-occurrence of anxiety and depressive-like behaviors following adolescent social isolation in male mice; possible role of nitrenergic system. **Physiol Behav**, v. 145, p. 38-44, Jun 1 2015.

ANDRE, C. et al. Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. **Brain Behav Immun**, v. 41, p. 10-21, Oct 2014.

ANDRE, C. et al. Inhibiting Microglia Expansion Prevents Diet-Induced Hypothalamic and Peripheral Inflammation. **Diabetes**, v. 66, n. 4, p. 908-919, Apr 2017.

ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res**, v. 43, n. 3, p. 521-31, Aug 15 1999.

ARNOLD, M. et al. Overweight duration in older adults and cancer risk: a study of cohorts in Europe and the United States. **Eur J Epidemiol**, Jun 14 2016.

ASLANI, S. et al. The effect of high-fat diet on rat's mood, feeding behavior and response to stress. **Transl Psychiatry**, v. 5, p. e684, 2015.

AUER, M. K. et al. Effects of a high-caloric diet and physical exercise on brain metabolite levels: a combined proton MRS and histologic study. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 35, n. 4, p. 554-64, Mar 31 2015.

AVENA, N. M.; HOEBEL, B. G. Amphetamine-sensitized rats show sugar-induced hyperactivity (cross-sensitization) and sugar hyperphagia. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, n. 3, p. 635-9, Feb 2003.

AVENA, N. M.; RADA, P.; HOEBEL, B. G. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, n. 1, p. 20-39, 2008.

- BARDO, M. T.; BEVINS, R. A. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 153, n. 1, p. 31-43, Dec 2000.
- BARGER, S. W. et al. Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. **J Neurochem**, v. 101, n. 5, p. 1205-13, Jun 2007.
- BARKER, G. R.; WARBURTON, E. C. Object-in-place associative recognition memory depends on glutamate receptor neurotransmission within two defined hippocampal-cortical circuits: a critical role for AMPA and NMDA receptors in the hippocampus, perirhinal, and prefrontal cortices. **Cereb Cortex**, v. 25, n. 2, p. 472-81, Feb 2015.
- BEIJAMINI, V.; GUIMARAES, F. S. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. **Brain Res Bull**, v. 69, n. 4, p. 347-55, Apr 28 2006a.
- BEIJAMINI, V.; GUIMARAES, F. S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. **Behav Brain Res**, v. 170, n. 1, p. 52-61, Jun 03 2006b.
- BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Short-term exposure to a diet high in fat and sugar, or liquid sugar, selectively impairs hippocampal-dependent memory, with differential impacts on inflammation. **Behav Brain Res**, v. 306, p. 1-7, Jun 01 2016.
- BESKE, S. D. et al. Reduced cardiovagal baroreflex gain in visceral obesity: implications for the metabolic syndrome. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 2, p. H630-5, Feb 2002.
- 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.
- BLANCO-GANDIA, M. C. et al. Effects of bingeing on fat during adolescence on the reinforcing effects of cocaine in adult male mice. **Neuropharmacology**, v. 113, n. Pt A, p. 31-44, Feb 2017.
- BOCARSLY, M. E. et al. Obesity diminishes synaptic markers, alters microglial morphology, and impairs cognitive function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 51, p. 15731-6, Dec 22 2015.
- BOCHE, D.; PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 39, n. 1, p. 3-18, Feb 2013.
- BODNOFF, S. R. et al. The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 95, n. 3, p. 298-302, 1988.
- BOURLIER, V.; BOULOUMIE, A. Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. **Diabetes Metab**, v. 35, n. 4, p. 251-60, Sep 2009.
- BOUTON, M. E. et al. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. **Biol Psychiatry**, v. 60, n. 4, p. 352-60, Aug 15 2006.
- 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.

BREDER, C. D. et al. Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 24, p. 11393-7, Nov 22 1994.

BREDET, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radic Res**, v. 31, n. 6, p. 577-96, Dec 1999.

BRITES, D.; FERNANDES, A. Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 476, 2015.

BRUCE-KELLER, A. J.; KELLER, J. N.; MORRISON, C. D. Obesity and vulnerability of the CNS. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 5, p. 395-400, May 2009.

BRYDON, L. Adiposity, leptin and stress reactivity in humans. **Biol Psychol**, v. 86, n. 2, p. 114-20, Feb 2011.

BUCHENAUER, T. et al. Diet-induced obesity alters behavior as well as serum levels of corticosterone in F344 rats. **Physiol Behav**, v. 98, n. 5, p. 563-9, Dec 7 2009.

CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 10, p. 766-75, Oct 2007.

CALHOON, G. G.; TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 10, p. 1394-404, Oct 2015.

CANCELLO, R.; CLEMENT, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **BJOG**, v. 113, n. 10, p. 1141-7, Oct 2006.

CAPURON, L.; MILLER, A. H. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. **Pharmacol Ther**, v. 130, n. 2, p. 226-38, May 2011.

CARDINAL, R. N. et al. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n. 3, p. 321-52, May 2002.

CEROVIC, M. et al. Molecular and cellular mechanisms of dopamine-mediated behavioral plasticity in the striatum. **Neurobiol Learn Mem**, v. 105, p. 63-80, Oct 2013.

CHAKRABARTY, K. et al. Glutamatergic dysfunction in OCD. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 9, p. 1735-40, Sep 2005.

CHEN, H. J. et al. Response of the nitroergic system to activation of the neuroendocrine stress axis. **Front Neurosci**, v. 9, p. 3, 2015.

CHESNOKOVA, V.; PECHNICK, R. N.; WAWROWSKY, K. Chronic peripheral inflammation, hippocampal neurogenesis, and behavior. **Brain Behav Immun**, Jan 21 2016.

CHIARINI, A. et al. Calcium-Sensing Receptors of Human Neural Cells Play Crucial Roles in Alzheimer's Disease. **Front Physiol**, v. 7, p. 134, 2016.

CHOWEN, J. A. et al. The role of astrocytes in the hypothalamic response and adaptation to metabolic signals. **Prog Neurobiol**, Mar 18 2016.

- CILLI, M. et al. Quantification of sub-clinical anxiety and depression in essentially obese patients and normal-weight healthy subjects. **Eat Weight Disord**, v. 8, n. 4, p. 319-20, Dec 2003.
- COLANTUONI, C. et al. Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence. **Obes Res**, v. 10, n. 6, p. 478-88, Jun 2002.
- COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 8, p. 1397-406, Aug 2001.
- CORDAIN, L. et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **Am J Clin Nutr**, v. 81, n. 2, p. 341-54, Feb 2005.
- COSTA, N. S. et al. Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? **Neuropharmacology**, v. 108, p. 82-90, Sep 2016.
- DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain Behav Immun**, v. 15, n. 1, p. 7-24, Mar 2001.
- DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 2, p. 153-60, Feb 2007.
- DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 46-56, Jan 2008.
- DARVAS, M.; FADOK, J. P.; PALMITER, R. D. Requirement of dopamine signaling in the amygdala and striatum for learning and maintenance of a conditioned avoidance response. **Learn Mem**, v. 18, n. 3, p. 136-43, Mar 2011.
- DE OLIVEIRA, C. L.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 56, n. 1, p. 55-9, Jan 1997.
- DE OLIVEIRA, M. C. et al. Platelet-activating factor modulates fat storage in the liver induced by a high-refined carbohydrate-containing diet. **J Nutr Biochem**, v. 26, n. 9, p. 978-85, Sep 2015.
- DE OLIVEIRA, R. M. et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. **Neurosci Lett**, v. 289, n. 2, p. 123-6, Aug 4 2000.
- DEEP, S. N. et al. Neuroprotective Role of L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) against Chronic Hypobaric Hypoxia with Crowding Stress (CHC) Induced Depression-Like Behaviour. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153371, 2016.
- DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 334-50, May 05 1999.
- DI GIROLAMO, G. et al. Effects of cyclooxygenase inhibitor pretreatment on nitric oxide production, nNOS and iNOS expression in rat cerebellum. **Br J Pharmacol**, v. 139, n. 6, p. 1164-70, Jul 2003.
- DINICOLANTONIO, J. J.; LUCAN, S. C. The wrong white crystals: not salt but sugar as aetiological in hypertension and cardiometabolic disease. **Open Heart**, v. 1, n. 1, p. e000167, 2014.

DONNADIEU-RIGOLE, H. et al. Prevalence of Psychoactive Substance Consumption in People With Obesity. **Subst Use Misuse**, v. 51, n. 12, p. 1649-1654, Oct 14 2016.

DREWNOWSKI, A. et al. Sweetness and food preference. **J Nutr**, v. 142, n. 6, p. 1142S-8S, Jun 2012.

DREWNOWSKI, A.; SPECTER, S. E. Poverty and obesity: the role of energy density and energy costs. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 1, p. 6-16, Jan 2004.

DUNKLEY, P. R. et al. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. **Brain Res**, v. 441, n. 1-2, p. 59-71, Feb 16 1988.

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.

DZOLJIC, E.; GRBATINIC, I.; KOSTIC, V. Why is nitric oxide important for our brain? **Funct Neurol**, v. 30, n. 3, p. 159-63, Jul-Sep 2015.

EGENSPERGER, R. et al. Microglial activation in Alzheimer disease: Association with APOE genotype. **Brain Pathol**, v. 8, n. 3, p. 439-47, Jul 1998.

ESPANOL, A. J. et al. Treatment with LPS plus INF-gamma induces the expression and function of muscarinic acetylcholine receptors, modulating NIH3T3 cell proliferation: participation of NOS and COX. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 22, p. 5154-67, Nov 2014.

EYRE, H. A. et al. A meta-analysis of chemokines in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 68, p. 1-8, Jul 4 2016.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, Jan 14 2010.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 115, n. 5, p. 911-9; quiz 920, May 2005.

FERREIRA, A. V. et al. High-carbohydrate diet selectively induces tumor necrosis factor-alpha production in mice liver. **Inflammation**, v. 34, n. 2, p. 139-45, Apr 2011.

FIEDOROWICZ, J. G. et al. Elevated prevalence of obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular risk factors in bipolar disorder. **Ann Clin Psychiatry**, v. 20, n. 3, p. 131-7, Jul-Sep 2008.

FIGEE, M. et al. Compulsivity in obsessive-compulsive disorder and addictions. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 26, n. 5, p. 856-68, May 2016.

FILIPOVIC, D. et al. Oxidative and nitrosative stress pathways in the brain of socially isolated adult male rats demonstrating depressive- and anxiety-like symptoms. **Brain Struct Funct**, v. 222, n. 1, p. 1-20, Jan 2017.

FLEGAL, K. M. et al. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. **JAMA**, v. 293, n. 15, p. 1861-7, Apr 20 2005.

FLUITMAN, S. et al. Lipopolysaccharide-induced cytokine production in obsessive-compulsive disorder and generalized social anxiety disorder. **Psychiatry Res**, v. 178, n. 2, p. 313-6, Jul 30 2010.



- FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J Neurochem**, v. 42, n. 1, p. 1-11, Jan 1984.
- FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, v. 33, n. 7, p. 829-37, 837a-837d, Apr 2012.
- FRENOIS, F. et al. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 516-31, Jun 2007.
- 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.
- GADEK-MICHALSKA, A. et al. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 6, p. 1655-62, 2013.
- GALDINO, G. S. et al. The Nitric oxide/CGMP/KATP pathway mediates systemic and central antinociception induced by resistance exercise in rats. **Int J Neurosci**, v. 125, n. 10, p. 765-73, 2015.
- GAMMOH, O. S. et al. Salivary Nitric Oxide, a Biomarker for Stress and Anxiety? **Psychiatry Investig**, v. 13, n. 3, p. 311-5, May 2016.
- GAO, Y. et al. Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. **Glia**, v. 62, n. 1, p. 17-25, Jan 2014.
- GARCIA PARDO, M. P. et al. Animal models of drug addiction. **Adicciones**, v. 0, n. 0, p. 862, Jan 12 2017.
- GARDNER, E. L.; ASHBY, C. R., JR. Heterogeneity of the mesotelencephalic dopamine fibers: physiology and pharmacology. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, n. 1, p. 115-8, Jan 2000.
- 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.
- GASS, J. T.; CHANDLER, L. J. The Plasticity of Extinction: Contribution of the Prefrontal Cortex in Treating Addiction through Inhibitory Learning. **Front Psychiatry**, v. 4, p. 46, 2013.
- GHASEMI, A.; ZAHEDIASL, S.; AZIZI, F. Elevated nitric oxide metabolites are associated with obesity in women. **Arch Iran Med**, v. 16, n. 9, p. 521-5, Sep 2013.
- GOMES, F. V. et al. Facilitation of CB1 receptor-mediated neurotransmission decreases marble burying behavior in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 2, p. 434-8, Mar 30 2011.
- GONDIM, O. S. et al. Benefits of Regular Exercise on Inflammatory and Cardiovascular Risk Markers in Normal Weight, Overweight and Obese Adults. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0140596, 2015.
- GOSHEN, I.; YIRMIYA, R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. **Front Neuroendocrinol**, v. 30, n. 1, p. 30-45, Jan 2009.

- GOSNELL, B. A. Sucrose intake enhances behavioral sensitization produced by cocaine. **Brain Res**, v. 1031, n. 2, p. 194-201, Jan 21 2005.
- GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER, J. R., JR. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Methods Enzymol**, v. 268, p. 237-46, 1996.
- GROSS, L. S. et al. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 5, p. 774-9, May 2004.
- GUILLEMOT-LEGRIS, O.; MUCCIOLI, G. G. Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. **Trends Neurosci**, v. 40, n. 4, p. 237-253, Apr 2017.
- 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.
- 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.
- HAAPAKOSKI, R. et al. Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1beta, tumour necrosis factor alpha and C-reactive protein in patients with major depressive disorder. **Brain Behav Immun**, v. 49, p. 206-15, Oct 2015.
- HAARMAN, B. C. et al. Neuroinflammation in bipolar disorder - A [(11)C]-(R)-PK11195 positron emission tomography study. **Brain Behav Immun**, v. 40, p. 219-25, Aug 2014.
- HABIB, S. S. et al. Relationship of serum novel adipokine chemerin levels with body composition, insulin resistance, dyslipidemia and diabetes in Saudi women. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 21, n. 6, p. 1296-1302, Mar 2017.
- HAJNAL, A.; SMITH, G. P.; NORGRÉN, R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 286, n. 1, p. R31-7, Jan 2004.
- HANTRAYE, P. et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. **Nat Med**, v. 2, n. 9, p. 1017-21, Sep 1996.
- HARTLAGE-RUBSAMEN, M.; LEMKE, R.; SCHLIEBS, R. Interleukin-1beta, inducible nitric oxide synthase, and nuclear factor-kappaB are induced in morphologically distinct microglia after rat hippocampal lipopolysaccharide/interferon-gamma injection. **J Neurosci Res**, v. 57, n. 3, p. 388-98, Aug 01 1999.
- HENRY, C. J. et al. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **J Neuroinflammation**, v. 5, p. 15, May 13 2008.
- HILAKIVI-CLARKE, L.; CHO, E.; ONOJAFE, I. High-fat diet induces aggressive behavior in male mice and rats. **Life Sci**, v. 58, n. 19, p. 1653-60, 1996.
- HILES, S. A. et al. Bidirectional Prospective Associations of Metabolic Syndrome Components with Depression, Anxiety, and Antidepressant Use. **Depress Anxiety**, Apr 27 2016.
- HINWOOD, M. et al. Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. **Cereb Cortex**, v. 22, n. 6, p. 1442-54, Jun 2012.

HOVENS, I. B.; NYAKAS, C.; SCHOEMAKER, R. G. A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. **Neuroimmunol Neuroinflamm**, v. 1, n. 2, p. 82-88, Sep 2014.

HU, F. B. Are refined carbohydrates worse than saturated fat? **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 6, p. 1541-2, Jun 2010.

HUESTON, C. M.; CRYAN, J. F.; NOLAN, Y. M. Stress and adolescent hippocampal neurogenesis: diet and exercise as cognitive modulators. **Transl Psychiatry**, v. 7, n. 4, p. e1081, Apr 04 2017.

HYODO, Y. et al. Immunological and metabolic reconstitution following successful bone marrow transplantation from a HLA-identical sibling in an infant with adenosine deaminase deficiency and severe combined immunodeficiency: partial restoration of purine metabolism. **Adv Exp Med Biol**, v. 253A, p. 543-7, 1989.

IMAI, Y.; KOHSAKA, S. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. **Glia**, v. 40, n. 2, p. 164-74, Nov 2002.

JIMURA, K. et al. Intertemporal Decision-Making Involves Prefrontal Control Mechanisms Associated with Working Memory. **Cereb Cortex**, p. 1-12, Feb 08 2017.

JOFFIN, N. et al. Is there NO help for leptin? **Biochimie**, v. 94, n. 10, p. 2104-10, Oct 2012.

JOHNSON, S. L.; MCPHEE, L.; BIRCH, L. L. Conditioned preferences: young children prefer flavors associated with high dietary fat. **Physiol Behav**, v. 50, n. 6, p. 1245-51, Dec 1991.

KALKMAN, H. O.; FEUERBACH, D. Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1-polarization. **Pharmacol Ther**, v. 163, p. 82-93, Jul 2016.

KILPI, F. et al. Alarming predictions for obesity and non-communicable diseases in the Middle East. **Public Health Nutr**, v. 17, n. 5, p. 1078-86, May 2014.

KITAGAMI, T. et al. Mechanism of systemically injected interferon-alpha impeding monoamine biosynthesis in rats: role of nitric oxide as a signal crossing the blood-brain barrier. **Brain Res**, v. 978, n. 1-2, p. 104-14, Jul 18 2003.

KNACKSTEDT, L. A. et al. Extinction training after cocaine self-administration induces glutamatergic plasticity to inhibit cocaine seeking. **J Neurosci**, v. 30, n. 23, p. 7984-92, Jun 09 2010.

KOLOTKIN, R. L.; METER, K.; WILLIAMS, G. R. Quality of life and obesity. **Obes Rev**, v. 2, n. 4, p. 219-29, Nov 2001.

KONTTINEN, H. et al. Longitudinal associations between depressive symptoms and body mass index in a 20-year follow-up. **Int J Obes (Lond)**, v. 38, n. 5, p. 668-74, May 2014.

KRASS, M. et al. Nitric oxide is involved in the regulation of marble-burying behavior. **Neurosci Lett**, v. 480, n. 1, p. 55-8, Aug 09 2010.

KREISEL, T. et al. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. **Mol Psychiatry**, v. 19, n. 6, p. 699-709, Jun 2014.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci**, v. 19, n. 8, p. 312-8, Aug 1996.

KRISHNA, S. et al. Neurochemical and electrophysiological deficits in the ventral hippocampus and selective behavioral alterations caused by high-fat diet in female C57BL/6 mice. **Neuroscience**, v. 297, p. 170-81, Jun 25 2015.

KRISHNA, S. et al. Time-dependent behavioral, neurochemical, and metabolic dysregulation in female C57BL/6 mice caused by chronic high-fat diet intake. **Physiol Behav**, v. 157, p. 196-208, Apr 1 2016.

KURHE, Y.; RADHAKRISHNAN, M.; GUPTA, D. Ondansetron attenuates depression co-morbid with obesity in obese mice subjected to chronic unpredictable mild stress; an approach using behavioral battery tests. **Metab Brain Dis**, v. 29, n. 3, p. 701-10, Sep 2014.

KUZUMAKI, N. et al. Enhanced IL-1beta production in response to the activation of hippocampal glial cells impairs neurogenesis in aged mice. **Synapse**, v. 64, n. 9, p. 721-8, Sep 2010.

LE THUC, O.; ROVERE, C. [Hypothalamic inflammation and energy balance deregulations: focus on chemokines.]. **Biol Aujourd'hui**, v. 210, n. 4, p. 211-225, 2016.

LEE, B. H. et al. Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. **Neuropsychobiology**, v. 53, n. 3, p. 127-32, 2006.

LEE, H.; CHANG, M. J.; KIM, S. H. Effects of poly-gamma-glutamic acid on serum and brain concentrations of glutamate and GABA in diet-induced obese rats. **Nutr Res Pract**, v. 4, n. 1, p. 23-9, Feb 2010.

LEGENDRE, A.; HARRIS, R. B. Exaggerated response to mild stress in rats fed high-fat diet. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 291, n. 5, p. R1288-1294, Nov 2006.

LEVINE, J. et al. Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. **Biol Psychiatry**, v. 47, n. 7, p. 586-93, Apr 01 2000.

LEVKOVITZ, Y. et al. Early post-stressor intervention with minocycline, a second-generation tetracycline, attenuates post-traumatic stress response in an animal model of PTSD. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 25, n. 1, p. 124-32, Jan 2015.

LI, J. et al. Increased sucrose intake and corresponding c-Fos in amygdala and parabrachial nucleus of dietary obese rats. **Neurosci Lett**, v. 525, n. 2, p. 111-6, Sep 13 2012.

LI, Y. Q. et al. [Sucrose reward promotes rats' motivation for cocaine]. **Sheng Li Xue Bao**, v. 68, n. 3, p. 233-40, Jun 25 2016.

LIANG, N. C.; HAJNAL, A.; NORGRÉN, R. Sham feeding corn oil increases accumbens dopamine in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 291, n. 5, p. R1236-9, Nov 2006.

LIDDIE, S. et al. The effect of phosphodiesterase inhibitors on the extinction of cocaine-induced conditioned place preference in mice. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 10, p. 1375-82, Oct 2012.

- LIEM, D. G.; DE GRAAF, C. Sweet and sour preferences in young children and adults: role of repeated exposure. **Physiol Behav**, v. 83, n. 3, p. 421-9, Dec 15 2004.
- LIN, S. et al. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24, n. 5, p. 639-46, May 2000.
- LISBOA, S. F. et al. Microglial Cells as a Link between Cannabinoids and the Immune Hypothesis of Psychiatric Disorders. **Front Neurol**, v. 7, p. 5, 2016.
- 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.
- 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. |
- LUFT, V. C. et al. Chronic inflammation role in the obesity-diabetes association: a case-cohort study. **Diabetol Metab Syndr**, v. 5, n. 1, p. 31, 2013.
- LUMENG, C. N. et al. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 1, p. 16-23, Jan 2007.
- LUSS, H. et al. Characterization of inducible nitric oxide synthase expression in endotoxemic rat cardiac myocytes in vivo and following cytokine exposure in vitro. **J Mol Cell Cardiol**, v. 27, n. 9, p. 2015-29, Sep 1995.
- LUTZ, T. A.; WOODS, S. C. Overview of animal models of obesity. **Curr Protoc Pharmacol**, v. Chapter 5, p. Unit5 61, Sep 2012.
- LYNCH, C. M. et al. Nox2-derived superoxide contributes to cerebral vascular dysfunction in diet-induced obesity. **Stroke**, v. 44, n. 11, p. 3195-201, Nov 2013.
- MADRIGAL, J. L. et al. The increase in TNF-alpha levels is implicated in NF-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 155-63, Feb 2002.
- MAKI, K. C.; PHILLIPS, A. K. Dietary substitutions for refined carbohydrate that show promise for reducing risk of type 2 diabetes in men and women. **J Nutr**, v. 145, n. 1, p. 159S-163S, Jan 2015.
- MALIK, V. S. et al. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 33, n. 11, p. 2477-83, Nov 2010.
- MALLOZZI, C. et al. Peroxynitrite induces tyrosine residue modifications in synaptophysin C-terminal domain, affecting its interaction with src. **J Neurochem**, v. 111, n. 3, p. 859-69, Nov 2009.
- MAREN, S.; HOLT, W. G. Hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats: muscimol infusions into the ventral, but not dorsal, hippocampus impair the acquisition of conditional freezing to an auditory conditional stimulus. **Behav Neurosci**, v. 118, n. 1, p. 97-110, Feb 2004.
- MARQUEZ, J. et al. Glutamate and Brain Glutaminases in Drug Addiction. **Neurochem Res**, Dec 23 2016.

MARTEL, P.; FANTINO, M. Mesolimbic dopaminergic system activity as a function of food reward: a microdialysis study. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 53, n. 1, p. 221-6, Jan 1996.

MCGEEHAN, A. J.; OLIVE, M. F. Attenuation of cocaine-induced reinstatement of cocaine conditioned place preference by acamprosate. **Behav Pharmacol**, v. 17, n. 4, p. 363-7, Jun 2006.

MCGEER, P. L. et al. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 1285-91, Aug 1988.

MEREDITH, G. E. et al. The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. **Brain Struct Funct**, v. 213, n. 1-2, p. 17-27, Sep 2008.

MESENCE, C. et al. Reduction of the neurological deficit in mice with traumatic brain injury by nitric oxide synthase inhibitors. **J Neurotrauma**, v. 13, n. 1, p. 11-6, Jan 1996.

MILADINOVIC, T.; NASHED, M. G.; SINGH, G. Overview of Glutamatergic Dysregulation in Central Pathologies. **Biomolecules**, v. 5, n. 4, p. 3112-41, Nov 11 2015.

MONTE, A. S. et al. Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitrenergic pathways. **J Psychopharmacol**, v. 27, n. 11, p. 1032-43, Nov 2013.

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.

MOORE, M. E.; STUNKARD, A.; SROLE, L. Obesity, social class, and mental illness. **JAMA**, v. 181, p. 962-6, Sep 15 1962.

MORALES, L. et al. Shift of circadian feeding pattern by high-fat diets is coincident with reward deficits in obese mice. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36139, 2012.

MORAN, T. H.; MCHUGH, P. R. Distinctions among three sugars in their effects on gastric emptying and satiety. **Am J Physiol**, v. 241, n. 1, p. R25-30, Jul 1981.

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.

MORRIS, M. J. et al. Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 58, p. 36-45, Nov 2015.

MUJICA-PARODI, L. R.; RENELIQUE, R.; TAYLOR, M. K. Higher body fat percentage is associated with increased cortisol reactivity and impaired cognitive resilience in response to acute emotional stress. **Int J Obes (Lond)**, v. 33, n. 1, p. 157-65, Jan 2009.

NAJJAR, S. et al. Neuroinflammation and psychiatric illness. **J Neuroinflammation**, v. 10, p. 43, Apr 01 2013.

NAJJAR, S. et al. Brain biopsy findings link major depressive disorder to neuroinflammation, oxidative stress, and neurovascular dysfunction: a case report. **Biol Psychiatry**, v. 75, n. 12, p. e23-6, Jun 15 2014.

NAKANE, M. Soluble guanylyl cyclase: physiological role as an NO receptor and the potential molecular target for therapeutic application. **Clin Chem Lab Med**, v. 41, n. 7, p. 865-70, Jul 2003.

NELSON, P. T.; SOMA, L. A.; LAVI, E. Microglia in diseases of the central nervous system. **Ann Med**, v. 34, n. 7-8, p. 491-500, 2002.

NERY, F. G. et al. Prevalence of depressive and anxiety disorders in systemic lupus erythematosus and their association with anti-ribosomal P antibodies. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 3, p. 695-700, Apr 01 2008.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-81, Aug 30 2014.

NICHOLLS, D. G.; SIHRA, T. S.; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. **J Neurochem**, v. 49, n. 1, p. 50-7, Jul 1987.

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S. L. Effects of 5-HT uptake inhibitors, agonists and antagonists on the burying of harmless objects by mice; a putative test for anxiolytic agents. **Br J Pharmacol**, v. 104, n. 1, p. 105-12, Sep 1991.

NORGREN, R.; HAJNAL, A.; MUNGARNDEE, S. S. Gustatory reward and the nucleus accumbens. **Physiol Behav**, v. 89, n. 4, p. 531-5, Nov 30 2006.

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.

OLSEN, N. J.; HEITMANN, B. L. Intake of calorically sweetened beverages and obesity. **Obes Rev**, v. 10, n. 1, p. 68-75, Jan 2009.

ONGUR, D.; PRICE, J. L. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. **Cereb Cortex**, v. 10, n. 3, p. 206-19, Mar 2000.

Organização Mundial de Saúde (OMS), Obesity and Overweight, Jun 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em 21 de Mar 2017.

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.

OWEN, N. et al. Sedentary behavior: emerging evidence for a new health risk. **Mayo Clin Proc**, v. 85, n. 12, p. 1138-41, Dec 2010.

PACE, T. W.; HEIM, C. M. A short review on the psychoneuroimmunology of posttraumatic stress disorder: from risk factors to medical comorbidities. **Brain Behav Immun**, v. 25, n. 1, p. 6-13, Jan 2011.

PACE, T. W.; MILLER, A. H. Cytokines and glucocorticoid receptor signaling. Relevance to major depression. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1179, p. 86-105, Oct 2009.

PAGE, K. A. et al. Effects of fructose vs glucose on regional cerebral blood flow in brain regions involved with appetite and reward pathways. **JAMA**, v. 309, n. 1, p. 63-70, Jan 02 2013.

- PASSOS, I. C. et al. Inflammatory markers in post-traumatic stress disorder: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. **Lancet Psychiatry**, v. 2, n. 11, p. 1002-12, Nov 2015.
- PATKI, G. et al. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. **Brain Res**, v. 1539, p. 73-86, Nov 20 2013.
- PENG, Y. L. et al. Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 75, 2012.
- PEREIRA-MIRANDA, E. et al. Overweight and Obesity Associated with Higher Depression Prevalence in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Am Coll Nutr**, p. 1-11, Apr 10 2017.
- POHLACK, S. T. et al. Activation of the ventral striatum during aversive contextual conditioning in humans. **Biol Psychol**, v. 91, n. 1, p. 74-80, Sep 2012.
- POTHUIZEN, H. H. et al. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. **Eur J Neurosci**, v. 19, n. 3, p. 705-12, Feb 2004.
- PROCACCINI, C. et al. Leptin as immune mediator: Interaction between neuroendocrine and immune system. **Dev Comp Immunol**, Jun 8 2016.
- QUEIROZ, E. M. et al. IGF2, LEPR, POMC, PPARG, and PPARGC1 gene variants are associated with obesity-related risk phenotypes in Brazilian children and adolescents. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 7, p. 595-602, Jul 2015.
- RADEWICZ, K. et al. Increase in HLA-DR immunoreactive microglia in frontal and temporal cortex of chronic schizophrenics. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 59, n. 2, p. 137-50, Feb 2000.
- RAMEAU, G. A.; CHIU, L. Y.; ZIFF, E. B. NMDA receptor regulation of nNOS phosphorylation and induction of neuron death. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 8, p. 1123-33, Dec 2003.
- RANGARAJU, S. et al. Potassium channel Kv1.3 is highly expressed by microglia in human Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 44, n. 3, p. 797-808, 2015.
- RAO, J. S. et al. Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients. **Mol Psychiatry**, v. 15, n. 4, p. 384-92, Apr 2010.
- RAZ, L.; KNOEFEL, J.; BHASKAR, K. The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 36, n. 1, p. 172-86, Jan 2016.
- REUS, G. Z. et al. Minocycline protects against oxidative damage and alters energy metabolism parameters in the brain of rats subjected to chronic mild stress. **Metab Brain Dis**, v. 30, n. 2, p. 545-53, Apr 2015.
- 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.



- RIBEIRO, B. M. et al. Evidences for a progressive microglial activation and increase in iNOS expression in rats submitted to a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine. **Schizophr Res**, v. 151, n. 1-3, p. 12-9, Dec 2013.
- RORABAUGH, J. M.; STRATFORD, J. M.; ZAHNISER, N. R. Differences in bingeing behavior and cocaine reward following intermittent access to sucrose, glucose or fructose solutions. **Neuroscience**, v. 301, p. 213-20, Aug 20 2015.
- SALIM, S.; CHUGH, G.; ASGHAR, M. Inflammation in anxiety. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v. 88, p. 1-25, 2012.
- 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.
- SANTOS, C. J. et al. Carbohydrate-enriched diet predispose to anxiety and depression-like behavior after stress in mice. **Nutr Neurosci**, p. 1-7, Jul 29 2016.
- SCHEERS, T.; PHILIPPAERTS, R.; LEFEVRE, J. Patterns of physical activity and sedentary behavior in normal-weight, overweight and obese adults, as measured with a portable armband device and an electronic diary. **Clin Nutr**, v. 31, n. 5, p. 756-64, Oct 2012.
- SCHMIDT, F. M. et al. Cytokine levels in depressed and non-depressed subjects, and masking effects of obesity. **J Psychiatr Res**, v. 55, p. 29-34, Aug 2014.
- SCOTT, K. M. et al. Obesity and mental disorders in the general population: results from the world mental health surveys. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, n. 1, p. 192-200, Jan 2008.
- SEMMLER, A. et al. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. **J Chem Neuroanat**, v. 30, n. 2-3, p. 144-57, Oct 2005.
- SENEVIRATNE, U. et al. S-nitrosation of proteins relevant to Alzheimer's disease during early stages of neurodegeneration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 15, p. 4152-7, Apr 12 2016.
- SHARMA, S.; FULTON, S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. **Int J Obes (Lond)**, v. 37, n. 3, p. 382-9, Mar 2013.
- SHELTON, R. C. et al. The pro-inflammatory profile of depressed patients is (partly) related to obesity. **J Psychiatr Res**, v. 70, p. 91-7, Nov 2015.
- SHEN, Y. et al. Differential effect of chronic antidepressant treatments on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavioural symptoms in the rat. **Life Sci**, v. 65, n. 17, p. 1773-86, 1999.
- SHEPHERD, J. K. et al. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 116, n. 1, p. 56-64, Sep 1994.
- SHERIF, I. O. Secoisolariciresinol diglucoside in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: a possible renoprotective effect. **J Physiol Biochem**, v. 70, n. 4, p. 961-9, Dec 2014.

- SIBA, I. P. et al. Fish oil prevents rodent anxious states comorbid with diabetes: A putative involvement of nitric oxide modulation. **Behav Brain Res**, v. 326, p. 173-186, Mar 08 2017.
- SILVA, G. C. et al. Endothelial dysfunction in DOCA-salt-hypertensive mice: role of neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide. **Clin Sci (Lond)**, v. 130, n. 11, p. 895-906, Jun 01 2016.
- SIMON, G. E. et al. Association between obesity and psychiatric disorders in the US adult population. **Arch Gen Psychiatry**, v. 63, n. 7, p. 824-30, Jul 2006.
- SIOPI, E. et al. Evaluation of late cognitive impairment and anxiety states following traumatic brain injury in mice: the effect of minocycline. **Neurosci Lett**, v. 511, n. 2, p. 110-5, Mar 09 2012.
- SIVANATHAN, S. et al. Chronic high fat feeding increases anxiety-like behaviour and reduces transcript abundance of glucocorticoid signalling genes in the hippocampus of female rats. **Behav Brain Res**, v. 286, p. 265-70, Jun 1 2015.
- SMITH, K. J. et al. Association of diabetes with anxiety: a systematic review and meta-analysis. **J Psychosom Res**, v. 74, n. 2, p. 89-99, Feb 2013.
- SOMINSKY, L.; WALKER, A. K.; HODGSON, D. M. Editorial: Neuroinflammation and behavior. **Front Neurosci**, v. 9, p. 201, 2015.
- SOUZA, C. G. et al. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. **Life Sci**, v. 81, n. 3, p. 198-203, Jun 27 2007.
- STANIMIROVIC, J. et al. A high fat diet induces sex-specific differences in hepatic lipid metabolism and nitrite/nitrate in rats. **Nitric Oxide**, v. 54, p. 51-9, Apr 1 2016.
- STEINER, J. et al. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. **J Psychiatr Res**, v. 42, n. 2, p. 151-7, Jan 2008.
- STRAWN, J. R. et al. A pilot study of anterior cingulate cortex neurochemistry in adolescents with generalized anxiety disorder. **Neuropsychobiology**, v. 67, n. 4, p. 224-9, 2013.
- STURT, J. Higher consumption of sugar-sweetened beverages is associated with increased risk of developing type 2 diabetes or metabolic syndrome. **Evid Based Nurs**, v. 14, n. 2, p. 35, Apr 2011.
- SUDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 509-47, 2004.
- SUGIMORI, M. et al. High-resolution measurement of the time course of calcium-concentration microdomains at squid presynaptic terminals. **Biol Bull**, v. 187, n. 3, p. 300-3, Dec 1994.
- TAKAKI, J. et al. L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 275, Dec 23 2012.
- THALER, J. P. et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin Invest**, v. 122, n. 1, p. 153-62, Jan 2012.

THANOS, P. K. et al. Obesity-resistant S5B rats showed greater cocaine conditioned place preference than the obesity-prone OM rats. **Physiol Behav**, v. 101, n. 5, p. 713-8, Dec 02 2010.

THOMAS, A. et al. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 204, n. 2, p. 361-73, Jun 2009.

TOMAZ, V. S. et al. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, v. 268, p. 236-46, May 30 2014.

TORRES-PLATAS, S. G. et al. Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. **Brain Behav Immun**, v. 42, p. 50-9, Nov 2014.

TRABACE, L.; KENDRICK, K. M. Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. **J Neurochem**, v. 75, n. 4, p. 1664-74, Oct 2000.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proc Nutr Soc**, v. 60, n. 3, p. 329-39, Aug 2001.

TREMBLAY, M. E. et al. The role of microglia in the healthy brain. **J Neurosci**, v. 31, n. 45, p. 16064-9, Nov 09 2011.

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. **Prog Neurobiol**, v. 56, n. 6, p. 613-72, Dec 1998.

\_\_\_\_\_. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. **Addict Biol**, v. 12, n. 3-4, p. 227-462, Sep 2007.

UMATHE, S. N. et al. Role of nitric oxide in obsessive-compulsive behavior and its involvement in the anti-compulsive effect of paroxetine in mice. **Nitric Oxide**, v. 21, n. 2, p. 140-7, Sep 2009.

VALLADOLID-ACEBES, I. et al. High-fat diets induce changes in hippocampal glutamate metabolism and neurotransmission. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 4, p. E396-402, Feb 15 2012.

VENTORP, F. et al. Exendin-4 Treatment Improves LPS-Induced Depressive-Like Behavior Without Affecting Pro-Inflammatory Cytokines. **J Parkinsons Dis**, Apr 04 2017.

VIEIRA, L. B. et al. PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K<sup>+</sup>-evoked increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release in synaptosomes. **Neurochem Int**, v. 42, n. 4, p. 277-82, Mar 2003.

VIGITEL Brasil 2015 Saúde Complementar: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília:Ministério da Saúde, 173 p. 2017.

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.

- VINUESA, A. et al. Juvenile exposure to a high fat diet promotes behavioral and limbic alterations in the absence of obesity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 72, p. 22-33, Jun 6 2016.
- VOGELZANGS, N. et al. Anxiety disorders and inflammation in a large adult cohort. **Transl Psychiatry**, v. 3, p. e249, 2013.
- VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; BALER, R. D. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. **Trends Cogn Sci**, v. 15, n. 1, p. 37-46, Jan 2011.
- WANG, G. et al. Effects of subacute exposure to 1,2-dichloroethane on mouse behavior and the related mechanisms. **Hum Exp Toxicol**, v. 32, n. 9, p. 983-91, Sep 2013.
- WANG, H. G. et al. Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins. **Neuron**, v. 45, n. 3, p. 389-403, Feb 03 2005.
- WANG, X. et al. Increased hypothalamic inflammation associated with the susceptibility to obesity in rats exposed to high-fat diet. **Exp Diabetes Res**, v. 2012, p. 847246, 2012.
- WEINBERG, J. B. et al. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. **Blood**, v. 86, n. 3, p. 1184-95, Aug 01 1995.
- WEYDT, P.; MOLLER, T. Neuroinflammation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. **Neuroreport**, v. 16, n. 6, p. 527-31, Apr 25 2005.
- WHITE, K. A. et al. Diet-induced obesity prolongs neuroinflammation and recruits CCR2(+) monocytes to the brain following herpes simplex virus (HSV)-1 latency in mice. **Brain Behav Immun**, v. 57, p. 68-78, Oct 2016.
- WILTINK, J. et al. Associations between depression and different measures of obesity (BMI, WC, WHtR, WHR). **BMC Psychiatry**, v. 13, p. 223, 2013.
- WOHLEB, E. S. et al. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. **Front Neurosci**, v. 8, p. 447, 2014.
- YAMAMOTO, K. et al. Presynaptic cell type-dependent regulation of GABAergic synaptic transmission by nitric oxide in rat insular cortex. **Neuroscience**, v. 284, p. 65-77, Jan 22 2015.
- YANG, L. et al. Systemic inflammation induces anxiety disorder through CXCL12/CXCR4 pathway. **Brain Behav Immun**, v. 56, p. 352-62, Aug 2016.
- YANG, L. P. et al. Acute Treatment with a Novel TRPC4/C5 Channel Inhibitor Produces Antidepressant and Anxiolytic-Like Effects in Mice. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136255, 2015.
- YANOVSKI, S. Sugar and fat: cravings and aversions. **J Nutr**, v. 133, n. 3, p. 835S-837S, Mar 2003.

YASOSHIMA, Y.; SHIMURA, T. A mouse model for binge-like sucrose overconsumption: Contribution of enhanced motivation for sweetener consumption. **Physiol Behav**, v. 138, p. 154-64, Jan 2015.

YUSTE, J. E. et al. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 322, 2015.

ZARRINDAST, M. R.; KHAKPAI, F. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. **Arch Iran Med**, v. 18, n. 9, p. 591-603, Sep 2015.

ZHANG, X. et al. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. **Exp Neurol**, v. 191, n. 2, p. 318-25, Feb 2005.

ZHU, L. et al. Esculetin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory processes and depressive-like behavior in mice. **Physiol Behav**, v. 163, p. 184-92, Sep 01 2016.

ZOICO, E. et al. Physical disability and muscular strength in relation to obesity and different body composition indexes in a sample of healthy elderly women. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 28, n. 2, p. 234-41, Feb 2004.