

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
NEUROCIÊNCIAS

DANIELA PEREIRA LAUREANO

EFEITO DE DIFERENTES DIETAS SOBRE A MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO
ALIMENTAR EM VIAS HOMEOSTÁTICAS E HEDÔNICAS EM RATAS FÊMEAS

Porto Alegre

2013

DANIELA PEREIRA LAUREANO

EFEITO DE DIFERENTES DIETAS SOBRE A MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO
ALIMENTAR EM VIAS HOMEOSTÁTICAS E HEDÔNICAS EM RATAS FÊMEAS

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Patrícia Pelufo Silveira

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
NEUROCIÊNCIAS

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

28 / 02 / 2013

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Profª Drª Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt
Universidade Federal do Espírito Santo

Profª Drª Carla Dalmaz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª Drª Leticia Ferreira Pettenuzzo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico mais essa conquista a meus pais Olmiro e Araci, a meus irmãos Viviane e Márcio, as minhas sobrinhas Nicole e Lauren, que são a razão do meu viver.

Agradeço todos os dias a Deus a oportunidade de tê-los como minha família.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a inteligência suprema, causa primária de todas as coisas: Deus. Aos espíritos de luz, sem essa força invisível eu não teria chegado até aqui. Aos meus familiares, tanto os que ainda estão aqui na Terra quanto os que já se foram pelo apoio que têm me dado. Principalmente a minha avó Luzia, que mesmo longe me amparou nos momentos mais difíceis do meu viver, estar em contato com ela me dá a certeza de que a vida continua. E a minha avó Jovita, cuidar dela me ensinou a exercitar as virtudes da paciência e resignação.

À minha família. Nós nascemos no lar que precisávamos, com a família e amigos que atraímos nada nessa vida acontece por acaso. Só tenho a agradecer a minha família, sempre me apoiando nos momentos difíceis. Sempre presente em todos os momentos. Meus pais, Araci e Olmiro são o meu porto seguro. Minha irmã Viviane, sempre será o meu exemplo. Meu irmão Márcio, laços de amor nos une. Minhas sobrinhas e afilhadas Nicole e Lauren são os melhores presentes que eu poderia receber. Apesar das adversidades, eu não mudaria nada na minha vida.

As pessoas entram em nossas vidas por uma razão, uma estação ou uma vida inteira, todos os que passam em nossas vidas deixam algo de bom. Agradeço aos meus amigos e pessoas que me ajudaram ao longo de minha vida, muito obrigada por tudo. Cada pessoa foi importante em uma determinada fase da vida, aprendi um pouco com cada uma delas.

À minha orientadora Patrícia Pelufo, muito obrigada pela oportunidade, sempre me ajudou em tudo o que foi possível. Gostaria de agradecer a prof^a Carla Dalmaz e seus alunos, ao prof^o Flavio Pereira Kapczinski e sua equipe. À equipe da Unidade de Experimentação Animal (UEA/HCPA).

Agradeço aos meus colegas do Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA) e Laboratório de Pediatria Translacional (LPT), principalmente ao André Portella, a Fernanda, a Juliana Colman, a Roberta Dalle Molle, o Fábio, o Márcio, meu muito obrigado. A Carla, que me ajudou principalmente no início do meu projeto. A Tania, amiga e companheira de todas as horas. A Cristie, muito obrigada pelo apoio nessa reta final.

Aos meus amigos de longa data, Leonardo Crema, contigo aprendi e ainda aprendo muita coisa. À Luísa, sempre presente em todas as horas, amiga de muitas vidas. À Márcia, companheira e amiga, juntas nós começamos essa jornada e juntas terminaremos ela.

Aos órgãos de pesquisa por terem viabilizado este trabalho. À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, pela oportunidade.

Uma noite eu tive um sonho:

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor, e através do céu, passavam cenas da minha vida. Para cada cena que se passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia; Um era meu e o outro era do Senhor. Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia, e notei que muitas vezes, no caminho da vida, havia apenas um par de pegadas na areia. Notei também que isto aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso aborreceu-me deveras.

Então perguntei ao Senhor:

- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvesse Te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o meu caminho, mas notei que durante as maiores tribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que mais necessitava de Ti, Tu me deixastes...

O Senhor respondeu:

- Meu precioso filho, eu te amo, e jamais te deixaria nas horas de tua prova e de teu sofrimento. Quando vistes na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí, que eu te carreguei nos Braços.

(atribuído a Mary Stevenson)

RESUMO

Introdução: A exposição crônica a diferentes tipos de dieta altera o metabolismo hipotalâmico e mesolímbico, podendo causar alterações no comportamento alimentar do indivíduo. O BDNF, fator de crescimento neuronal, pode atuar na modulação do comportamento alimentar tanto em vias hedônicas quanto homeostáticas. O objetivo do estudo foi investigar como o BDNF atua na modulação do comportamento alimentar em vias homeostáticas e hedônicas em ratas fêmeas com diferentes perfis metabólicos. **Materiais e métodos:** Ratas Wistar fêmeas adultas randomizadas por peso foram divididas em: dieta controle (C) contendo 22% de proteína e 4% de lipídios; dieta hipoproteica (LP) 8% de proteína ou dieta hiperlipídica (HF) 45% de lipídios, *ad libitum*, por 5 semanas, sendo o consumo medido a cada 72 horas e o peso semanalmente. O trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira parte, após as 5 semanas de dieta os animais ficaram em jejum por 4 horas e foram expostos ao alimento doce (Froot Loops®), previamente pesado, por 1 hora, a fim de verificar o consumo de alimento palatável em ratas com diferentes perfis metabólicos. Imediatamente após coletou-se sangue e cérebro, assim como, o peso da gordura abdominal foi mensurado. Na segunda parte do estudo, após as 5 semanas de dieta, os animais ficaram durante 7 dias no BioDAQ®, um sistema computadorizado de análise do comportamento alimentar, para avaliar o consumo da dieta habitual em ratas com diferentes perfis metabólicos. O consumo foi mensurado através de mordidas (diferença de 0,1 g na balança) e refeições (conjunto de porções por um tempo igual ou menor a 15 min, porções são mordidas ininterruptas). No dia 10 foi realizado o teste de preferência alimentar no qual o animal poderia escolher entre a dieta habitual (dieta que eles receberam por 5 semanas) ou a dieta hipersacarídica (HP) (contendo 34% lipídios, 30,2% carboidratos, 14% proteínas, 20% sacarose), com duração de 20 horas. Após 1 semana, foi coletado sangue, cérebro e mensurada a gordura abdominal. Foi realizado *western blotting* para tirosina hidroxilase (TH) e fosfo-tirosina hidroxilase (pTH) no núcleo accumbens, STAT3 e fosfo-STAT3 (pSTAT3) no hipotálamo. Adicionalmente, foi mensurado BDNF no soro, no núcleo do trato solitário (NTS), área tegmentar ventral (VTA) e glicemia no soro. **Resultados:** Nas 5 semanas de tratamento, em relação ao ganho de peso dos animais não houve diferenças significativas entre os grupos, não houve interação, apenas apresentaram efeito do tempo ($p < 0,001$). A gordura abdominal foi maior nas ratas HF ($p = 0,002$) e LP ($p = 0,023$) em relação aos controles. Os animais que receberam dieta HF comeram menos gramas de Froot Loops® do que os animais controle ($p = 0,003$). Durante a habituação ao BioDAQ® não houve diferença significativa no consumo de dieta entre os grupos. Na análise do comportamento alimentar no BioDAQ®, comparando os grupos controle *versus* hiperlipídica (C x HF), animais HF tiveram o tamanho da refeição (g) ($p = 0,049$), número de porções ($p < 0,001$), tamanho da refeição ciclo escuro ($p = 0,002$), número de porções ciclo escuro ($p < 0,001$) menor do que os controles e tamanho da porção ciclo escuro ($p = 0,006$) maior do que os controles. Na análise do comportamento alimentar, comparando os grupos controle *versus* hipoproteica (C x LP) foram encontradas diferenças significativas nos seguintes parâmetros: média do tamanho da porção (g) ($p = 0,004$), média do tamanho da porção no ciclo claro (g) ($p = 0,042$), média do tamanho da refeição no ciclo escuro (g) ($p = 0,035$), média do tamanho da porção no ciclo escuro (g) ($p = 0,006$). Em todos os parâmetros os animais LP tiveram uma média maior do que os animais controle. No teste de preferência alimentar, os animais HF apresentaram uma média inferior aos animais controle nos seguintes parâmetros: consumo de dieta hipersacarídica (Kcal) ($p = 0,034$), número de refeições de dieta hipersacarídica ($p = 0,016$), número de porções de dieta hipersacarídica ($p = 0,001$). Os animais HF apresentaram médias superiores aos animais C em relação ao tamanho da porção de dieta hipersacarídica (g) ($p = 0,023$), PMI (intervalo entre refeições) total de dieta hipersacarídica ($p = 0,022$), saciedade

total de dieta hipersacarídica ($p= 0,008$). Durante o teste de preferência alimentar comparando-se controle *versus* hipoproteica (C x LP), os animais (LP) apresentaram o consumo de dieta hipersacarídica (kcal) ($p= 0,030$) e o número de porções de dieta hipersacarídica ($p= 0,003$) menor que os animais controles. Os animais LP apresentaram saciedade total de dieta hipersacarídica ($p= 0,046$) maior do que os controles. Não houve diferenças significativas nos níveis de glicemia no soro entre os grupos. Os animais HF apresentaram as médias de pSTAT3 maior do que os controles ($p= 0,013$) e fosfo-tirosina hidroxilase menor do que os controles ($p= 0,05$). Os animais LP apresentaram STAT3 menor do que os animais controle ($p= 0,035$) e tiveram resultados de BDNF próximos da significância ($p=0,053$), tendo apresentado uma média inferior aos animais controle. **Conclusões:** A exposição aos diferentes tipos de dieta muda os padrões de alimentação bem como a estrutura corpórea. Tanto animais expostos a dieta HF quanto a LP apresentam alterações compatíveis com um estado de pré-resistência à leptina. O BDNF parece modular as vias homeostáticas e hedônicas do comportamento alimentar, no entanto mais estudos são necessários para entendermos melhor esses mecanismos.

Palavras-chave: comportamento alimentar, dopamina, tirosina hidroxilase, BDNF.

ABSTRACT

Introduction: The chronic exposure to different types of diet modifies the hypothalamic and mesolimbic metabolism, what can lead to changes in the individual feeding behavior. BDNF, a neuronal growing factor, can act modulating feeding behavior in hedonic as well as in homeostatic pathways. The aim of this study was to investigate how BDNF acts modulating feeding behavior regarding hedonic and homeostatic pathways in female rats with different metabolic profiles. **Materials and methods:** Female adult Wistar rats randomized by weight were divided in: control diet (C) with 22% of protein and 4% of lipids; low-protein diet (LP) with 8% of protein or high fat diet (HF) with 45% of lipids, *ad libitum*, for 5 weeks, with the diet consumption verified every 72 hours and the weight verified weekly. The study was divided in two parts. In the first part, after 5 weeks receiving diet, animals were submitted to 4 hours of fasting and then were exposed to sweet food (Froot Loops®), previously weighted, for 1 hour to verify the palatable food consumption in rats with different metabolic profiles. Immediately after, blood and brain were collected and the abdominal fat weight was verified. In the second part of the study, after 5 weeks receiving diet, the animals were submitted to the BioDAQ®, a computer system of feeding behavior analyses, to evaluate the habitual diet consumption in rats with different metabolic profiles for 7 days. The consumption was measured through bites (0.1g of difference in the scale) and meals (a group of portions for a period of time less or equal than 15min, portions are uninterrupted bites). On day 10 the food preference test was done and the animals could choose between the habitual diet (the one they have received for 5 weeks) and the high sucrose palatable diet (HP) (with 34% of lipids, 30.2% of carbohydrates, 14% of protein, 20% of sucrose) for a period of 20 hours. After one week, blood and brain were collected and abdominal fat was measured. *Western blotting* was used to verify the content of tyrosine hydroxylase (TH) and phospho-tyrosine hydroxylase (pTH) in the nucleus accumbens, STAT3 and phospho-STAT3 (pSTAT3) in the hypothalamus. Additionally, BDNF was measured in the serum, in the solitary tract nucleus (NTS) and in the ventral tegmental area (VTA) and glycemia was also verified. **Results:** Considering the 5 weeks of treatment regarding animals weight gain there was no significant difference between groups and no interaction, only an effect of time ($p < 0.001$). Abdominal fat was higher in HF ($p = 0.002$) and LP ($p = 0.023$) rats comparing to controls. Animals that received HF diet ate less grams of Froot Loops® than controls ($p = 0.003$). During the habituation to the BioDAQ® no significant difference was seen in the consumption of the diet between the groups. When analyzing feeding behavior in the BioDAQ®, comparing control against high fat groups (C x HF), HF animals had a decrease in the size of the meal (g) ($p = 0.049$), number of portion ($p < 0.001$), meal size in the dark phase ($p = 0.002$), number of portions in the dark phase ($p < 0.001$) compared to controls while the size of the portion in the dark phase ($p = 0.006$) was bigger than controls. Analyzing feeding behavior comparing control against low-protein groups (C x LP) a significant difference was observed in the following parameters: average of the size of the portion (g) ($p = 0.004$), average of the size of the portion in the light phase (g) ($p = 0.042$), average of the size of the meal in the dark phase (g) ($p = 0.035$), average of the size of the portion in the dark phase (g) ($p = 0.006$). LP animals showed a higher average than controls in all parameters. In the food preference test, HF animals showed a lower average than controls in the following parameters: consumption of high sucrose palatable diet (Kcal) ($p = 0.034$), number of meals of high sucrose palatable diet ($p = 0.016$), number of portions of high sucrose palatable diet ($p = 0.001$). HF animals showed higher averages than controls regarding the size of the portion of the high sucrose palatable diet (g) ($p = 0.023$), total PMI (post interval meal) of high sucrose palatable diet ($p = 0.022$) and total satiety of high sucrose palatable diet ($p = 0.008$). In the food preference test comparing controls against low-protein groups (C x LP), LP animals showed a lower consumption of

high sucrose palatable diet (Kcal) ($p=0.030$) and a lower number of portions of high sucrose palatable diet ($p=0.003$) than control animals. LP animals showed total satiety of high sucrose palatable diet ($p=0.046$) bigger than controls. There was no significant difference in the glycemia levels between groups. HF animals had pSTAT3 averages higher than controls ($p=0.013$) and phospho-tyrosine hydroxylase lower than controls ($p=0.05$). LP animals showed STAT3 lower than control animals ($p=0.035$) and had BDNF results close to the significance ($p=0.053$), showing a lower average than control animals. **Conclusion:** The exposure to different types of diets changes the feeding patterns as well as the body structure. Animals exposed to HF diet as well as those exposed to LP diet showed changes related to a leptin pre-resistant state. BDNF seems to modulate homeostatic and hedonic feeding behavior pathways, however more studies are necessary to a better understanding of the mechanisms.

Keywords: feeding behavior, dopamine, tyrosine hydroxylase, BDNF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho experimental do estudo.	35
Figura 2	Dados do consumo dos animais processados pela central do BioDAQ® e abertos no computador com o programa <i>Data Viewer</i> .	38
Figura 3	Esquema ilustrando a diferença entre refeições (<i>meals</i>) e porções (<i>bouts</i>) do BioDAQ®.	39
Figura 4	Vista do BioDAQ®. Cada caixa em que o animal se encontra está conectada a uma central (A) que envia as informações diretamente ao computador (B).	39
Figura 5	Vista do BioDAQ®. Balanças e comedouros conectados à caixa moradia.	40
Figura 6	Vista do BioDAQ®. Teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica. No primeiro comedouro ficava a dieta que eles receberam durante as 5 semanas, no segundo comedouro ficava a dieta hipersacarídica.	40
Figura 7	Peso ao longo da exposição às dietas. ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo ($p < 0,001$), sem interação (0,588), sem efeito do grupo ($p = 0,635$). N= 16-18 animais/grupo.	45
Figura 8	Peso ao longo da exposição às dietas. ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo ($p < 0,001$), sem interação (0,456), sem efeito do grupo ($p = 0,975$). N= 16-18 animais/grupo.	46
Figura 9	Porcentagem da relação gordura abdominal/peso final. Teste t de Student ($p = 0,002$). N= 23-24 animais/grupo.	47
Figura 10	Porcentagem da relação gordura abdominal/peso final. Teste t de Student ($p = 0,023$). N= 23 animais/grupo.	47
Figura 11	Teste de exposição aguda ao alimento doce com o Froot Loops® durante 1 hora (controle versus hiperlipídica).	48
Figura 12	Teste de exposição aguda ao alimento doce com exposição com o Froot Loops® durante 1 hora (controle versus hipoproteica).	49
Figura 13	Consumo em Kcal durante a habituação ao BioDAQ® (controle versus hiperlipídica).	50
Figura 14	Consumo em Kcal durante a habituação ao BioDAQ® (controle versus hipoproteica).	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização do consumo de ração durante o período de análise do comportamento alimentar no BioDAQ® grupos controle e hiperlipídica.	52
Tabela 2	Caracterização do consumo de ração durante o período de análise do comportamento alimentar no BioDAQ® grupos controle e hipoproteica.	53
Tabela 3	Caracterização do comportamento alimentar durante o teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica (HP) no BioDAQ® medidas totais dos grupos controle e hiperlipídica	55
Tabela 4	Caracterização do comportamento alimentar durante o teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica (HP) no BioDAQ® medidas totais dos grupos controle e hipoproteica.	56
Tabela 5	Caracterização do comportamento alimentar durante o teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica (HP) no BioDAQ® medidas divididas por ciclo dos grupos controle e hiperlipídica.	57
Tabela 6	Caracterização do comportamento alimentar durante o teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica (HP) no BioDAQ® medidas divididas por ciclo dos grupos controle e hipoproteica.	58
Tabela 7	Análises bioquímicas: medidas periféricas grupos controle e hiperlipídica.	59
Tabela 8	Análises bioquímicas: medidas periféricas grupos controle e hipoproteica.	59
Figura 9	Análises bioquímicas: medidas centrais grupos controle e hiperlipídica.	60
Figura 10	Análises bioquímicas: medidas centrais grupos controle e hipoproteica.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	giro cingulado
AgPR	peptídeo relacionado ao gene cutia
ANKK1	<i>Ankyrincontaining kinase 1</i>
ARC	núcleo arqueado
BDNF	fator neurotrófico derivado do encéfalo
C	dieta controle
CART	peptídeo relacionado à cocaína e anfetamina
CCK	colecistocinina
CRH	hormônio liberador de corticotropina
DAT	transportador de dopamina
DHM	hipotálamo dorsomedial
D2	receptor de dopamina do tipo 2
D4	receptor de dopamina do tipo 4
d2r2	gene dopaminérgico D2 do receptor 2
DVC	complexo dorsal vagal
E.P	erro-padrão
EPI	equipamento de proteção individual
ERK / MAP quinase	MAP quinase regulada por sinal extracelular
FEPPS	Fundação estadual de produção e pesquisa em saúde
GABA	ácido γ aminobutírico
GHRH	hormônio liberador do hormônio do crescimento
GHS-R1a	receptor de grelina
GPPG	Comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HCPA	Hospital de Clínicas de Clínicas de Porto Alegre
HF	dieta hiperlipídica
HP	dieta hipersacarídica
HT	hipotálamo
ICV	intracerebroventricular
IGJ	intolerância à glicose de jejum
IMC	índice de massa corporal
JAK2	Janus quinase do tipo 2
LHA	hipotálamo lateral
LP	dieta hipoproteica
MAP quinase	proteína quinase ativada por mitógenos
Met	metionina

MCH	hormônio concentrador de melanina
MC3	receptor de melanocortina 3
MC4	receptor de melanocortina 4
mPFC	córtex pré-frontal
NAC	núcleo accumbens
NGF	fator do crescimento nervoso
NPY	neuropeptídeo Y
NTS	núcleo do trato solitário
ObRb	receptor de leptina
OFC	córtex orbitofrontal
PIAS	proteína inibidora da STAT ativada
PI3K	3-fosfoinositol
PMI	intervalo entre refeições
POMC	proopiomelanocortina
pSTAT3	fosfo- STAT3
pTH	fosfo-tirosina hidroxilase
PTP	proteína tirosina fosfatase
PVN	núcleo paraventricular
PYY ₃₋₃₆	peptídeo YY (3-36)
RPM	rotações por minuto
SOCS	supressor de sinalização de citocina
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
STAT3	proteína transdutora de sinal e transcrição do tipo 3
TH	tirosina hidroxilase
TrkB	receptor de BDNF tirosina quinase B
TSH	hormônio estimulante da tireóide
UEA-HCPA	Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Val	valina
VHM	núcleo ventromedial
VTA	área tegmentar ventral
α -MSH	α -hormônio estimulador de melanócito
5-HT3	5-hidroxitriptamina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Obesidade: uma questão de saúde pública	16
1.1.2 Vulnerabilidade do sexo feminino à obesidade	18
1.2 Regulação do comportamento alimentar	19
1.2.1 Regulação periférica do comportamento alimentar	20
1.2.1.1 Sinais de saciedade	20
1.2.1.2 Sinais de fome	21
1.2.1.3 Sinais de adiposidade	22
1.2.2 Regulação central do comportamento alimentar	22
1.2.2.1 Hipotálamo e o controle homeostático do apetite	22
1.2.2.2 Controle hedônico do apetite	25
1.2.2.3 O papel da leptina e do BDNF na regulação do comportamento alimentar	27
2 HIPÓTESE	32
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Método geral	34
4.1.1 Animais experimentais e exposição crônica as dietas	34
4.1.2 Coleta de sangue e dissecação de estruturas e tecidos	35
4.1.3 Rotinas/normas de segurança e descarte dos rejeitos	36
4.2 Experimentos comportamentais	36
4.2.1 Teste de exposição aguda ao alimento doce - exposição 1 hora ao Froot Loops®	36
4.2.2 Consumo episódico	37
4.3 Análises bioquímicas	41
4.3.1 Medidas periféricas	41
4.3.1.1 Medida da glicemia no soro	41
4.3.1.2 Quantificação de BDNF por ELISA no soro e estruturas	41
4.3.2 Medidas centrais	42

4.3.2.1 Western blotting	42
4.4 Considerações éticas	43
4.5 Análise estatística	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Medidas gerais	45
5.2 Experimentos comportamentais	48
5.2.1 Teste de exposição aguda ao alimento doce - exposição 1 hora ao Froot Loops®	48
5.2.2 Habituação ao BioDAQ®	49
5.2.3 Análise do comportamento alimentar durante exposição ao BioDAQ®	51
5.2.4 Teste de preferência alimentar – Dieta hipersacarídica (HP) no BioDAQ®	54
5.3 Medidas periféricas	58
5.4 Medidas centrais	59
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade: uma questão de saúde pública

Nas últimas décadas houve um significativo aumento nos níveis de obesidade na população mundial, começando a substituir em números as doenças infecciosas e a desnutrição. A obesidade está associada com *diabetes mellitus*, doença coronariana, certos tipos de câncer e transtornos do sono (KOPELMAN, 2000). A obesidade é definida pelo índice de massa corporal - IMC (peso dividido pelo quadrado da altura), de 30 ou mais (KOPELMAN, 2000).

A epidemia global de obesidade resulta de uma combinação de susceptibilidade genética, maior disponibilidade de alimentos ricos em energia e diminuição da exigência de atividade física na sociedade moderna (KOPELMAN, 2000). A obesidade não deve mais ser considerada simplesmente como um problema estético que afeta certos indivíduos, mas uma epidemia que ameaça globalmente o bem-estar (KOPELMAN, 2000). A dieta rica em gordura é um dos principais responsáveis pela epidemia da obesidade (PEREIRA-LANCHA *et al.*, 2010), assim como o sedentarismo. Os avanços tecnológicos, tais como utensílios domésticos automatizados, a internet, e o maior acesso a essas inovações contribuíram para o aumento do sedentarismo (JAMES, 2008). Desde a década de 90 a indústria alimentícia tem desenvolvido mais alimentos prontos e ricos em lipídios, sal, açúcares e ácidos graxos. Essas mudanças foram feitas de acordo com as preferências da sociedade ocidental (JAMES, 2008). Refeições regulares deram lugar a lanches. Isto por sua vez, significa que o sistema regulatório cerebral tem um maior esforço para limitar o consumo, não mais tentando operar com base em 3 ou 4 refeições regulares por dia, mas tentando ir contra a incessante pressão sobre as pessoas em comprar produtos prontos, com forte *marketing*, atraentes e com imediata gratificação. Além do mais, o alto preço de frutas e verduras desencoraja o seu consumo (JAMES, 2008) facilitando o consumo de alimentos não tão saudáveis.

Diferentes tipos de dieta podem induzir a obesidade. Estudos demonstram que dieta rica em gordura diminui os níveis de leptina, reduzindo a saciedade e levando a hiperfagia, com conseqüente ganho de peso (AINSLIE *et al.*, 2000; SURWIT *et al.*, 1995). Em um trabalho de LOMBA *et al.* (2010), animais que receberam dietas ricas em gordura comparados com controles apresentaram aumento do peso corporal, adiposidade e tolerância à glicose diminuída, propondo que a dieta hiperlipídica produz sobrepeso independente do total

de energia consumida. Este autor sugere ainda que a dieta hiperlipídica poderia induzir mudanças epigenéticas relacionadas à alterações metabólicas (LOMBA *et al.*, 2010).

O consumo de diversos alimentos hiperpalatáveis simultaneamente pode levar a hiperfagia e desenvolvimento de obesidade (ROLLS *et al.*, 1982), podendo o mesmo estar relacionado a fatores hedônicos. Há estudos relacionando a obesidade não à superalimentação e sim a padrões de alimentação alterados; por exemplo, ratos que receberam dieta hiperlipídica apresentaram aumento de peso corporal e adiposidade, maior quantidade de calorias ingeridas/refeição, menor número de refeições por dia, consumindo maior quantidade em gramas/minuto (FURNES *et al.*, 2009). Ou seja, animais expostos à dieta rica em gordura comem menos vezes por dia e em maior quantidade. Indivíduos obesos e/ou com transtornos alimentares podem apresentar esse tipo de comportamento.

Indivíduos obesos comparados a indivíduos com IMC normal mostraram aumento da ativação de circuitos de recompensa (ROTHEMUND *et al.*, 2007). Estudos mostram a relação entre aumento da sensibilidade à recompensa e aumento de peso em humanos, sendo assim a sensibilidade a recompensa um fator de risco a obesidade (DAVIS *et al.*, 2004). Sugere-se que os baixos níveis do receptor D2 nas regiões mesolímbicas de obesos poderia predispor estes sujeitos a abuso de drogas (ou comida) como uma maneira de compensar a ativação diminuída dos sistemas de recompensa (VOLKOW *et al.*, 1999). Mulheres obesas apresentam mais anedonia do que mulheres com sobrepeso (DAVIS *et al.*, 2004). O estriado dorsal é menos reativo à recompensa à comida em obesos por esta reduzida densidade de receptores D2 e comprometida sinalização de dopamina, o que leva os indivíduos à hiperfagia como forma de compensar o déficit da recompensa (STICE *et al.*, 2008). Os receptores D2 regulam a responsividade estriatal ao alimento palatável e a sua sinalização diminuída pode induzir o ganho de peso (KENNY, 2011).

Um estudo mostrou que ratos propensos à obesidade que receberam dieta rica em gordura durante 3 semanas apresentaram um sistema dopaminérgico accumbal menos sensível a sinais fisiológicos específicos relacionados à ingestão de gordura, tais como elevados níveis circulantes de triglicerídeos, que atuam sobre a atividade do sistema dopaminérgico (RADA *et al.*, 2010). Este achado demonstra que o desenvolvimento da obesidade é associado com a disfunção da transmissão dopaminérgica mesoestriatal, mais proeminente nos receptores D2 no estriado, e a sinalização deficiente de receptores D2 contribui para a emergência do déficit da recompensa durante o desenvolvimento de obesidade em ratos (KENNY, 2011).

Por outro lado dietas hipoproteicas também podem levar à obesidade. Usualmente relacionam-se dietas hiperlipídicas e de cafeteria ao desenvolvimento da obesidade (LOMBA

et al., 2010; MACEDO *et al.*, 2012). No entanto, o alimento pobre em proteína também pode influenciar no aumento de peso. Em humanos, dietas hipoproteicas podem levar à obesidade e hiperfagia (DULLO; JACQUET, 1999), sendo que o aumento da quantidade de comida consumida é uma maneira de compensar o déficit nutricional desse tipo de dieta.

A exposição crônica a dietas pobres em proteínas pode levar a um déficit de aminoácidos e a desregulação na neurotransmissão do sistema nervoso central (YOUNG, 1996). Podemos citar como exemplo a dieta pobre em triptofano (aminoácido precursor da serotonina), que pode desencadear no indivíduo sintomas depressivos (YOUNG *et al.*, 1985; VAN der DOES, 2001). Um estudo mostrou que animais que receberam dieta hipoproteica (4% proteína) durante 11 dias apresentaram aumento da exploração no labirinto em cruz elevado e aumento de norepinefrina no estriado (LIEBERMAN *et al.*, 2005). A dieta hipoproteica em geral leva a hiperfagia (APARECIDA de FRANÇA *et al.*, 2009) e aumento da adiposidade (WHITE *et al.*, 2000, WHITE *et al.*, 1994) isso é um mecanismo adaptativo para tentar suprir a falta energética.

1.1.2 Vulnerabilidade do sexo feminino à obesidade

Um dos fatores relacionados à vulnerabilidade do sexo feminino à obesidade é a ciclicidade hormonal. Enquanto o aumento plasmático nos níveis de estradiol diminui a ingesta alimentar e aumenta o exercício voluntário levando à perda de peso corporal (WADE, 1972; GEARY 2001), ratas submetidas à ovariectomia apresentam o aumento do tamanho da refeição e diminuição da frequência da mesma (GEARY, 2001).

As mais prevalentes formas de distúrbios alimentares são caracterizadas pela compulsão alimentar, que é o consumo de uma grande quantidade de alimento dentro de um curto período e a perda de controle da ingesta alimentar durante o episódio (KLUMP *et al.*, 2011). A compulsão alimentar é a principal característica da bulimia, transtorno alimentar caracterizado por períodos de compulsão alimentar seguidos por comportamentos não saudáveis para perda de peso rápido como induzir vômito, uso de laxantes, abuso de cafeína, uso de cocaína e/ou dietas inadequadas (WALSH, 2011). Distúrbios alimentares (como a bulimia) são mais prevalentes em mulheres do que homens (JOHNSON *et al.*, 2001). Hormônios ovarianos estão entre os principais candidatos a mediadores neurobiológicos da síndrome da bulimia em mulheres (KLUMP *et al.*, 2011).

A constituição corpórea do homem é diferente da mulher, ou seja, o corpo feminino tem maior percentual de gordura. Conseqüentemente, produz e libera maior quantidade de

leptina (WABISCH *et al.*, 2001). Em contraste, homens têm mais desenvolvimento de adiposidade abdominal, que é associado com o aumento de comorbidades (NOOKAEW *et al.*, 2013). Os níveis de leptina são sexo-específicos, aumentando na mulher a partir da puberdade, devido ao aumento da adiposidade corporal nesse período (WABISCH *et al.*, 2001). Durante a gestação, os níveis de leptina também aumentam vertiginosamente, chegando até mesmo a duplicar, no entanto no pós-parto há uma queda abrupta dos mesmos levando a uma dessensibilização dos receptores (RUMP *et al.*, 2001), fato que poderia explicar a dificuldade da perda de peso no pós-parto. A resistência à leptina durante a gravidez é um mecanismo fisiológico que proporciona aumento de reservas de energia para atender a alta demanda do desenvolvimento fetal e a lactação (GRATTAN *et al.*, 2007).

1.2 Regulação do comportamento alimentar

Comportamentos motivados são impulsos que nos levam a realizar certos ajustes corporais ou comportamentais, visando à perpetuação da espécie e a homeostase (LENT, 2010). Esses comportamentos envolvem 2 tipos de ações, os comportamentos apetitivos e os comportamentos consumatórios. Os **comportamentos apetitivos** são atos preparatórios para a satisfação da necessidade motivante. Os **comportamentos consumatórios** são a realização da satisfação final. No caso do comportamento alimentar, por exemplo, a busca pelo alimento caracteriza o comportamento apetitivo, e o ato de comer seria o comportamento consumatório (LENT, 2010).

O comportamento alimentar é um comportamento motivado essencial à sobrevivência, envolvendo diversos e complexos mecanismos de regulação. Nós podemos dividir o ato da alimentação em 3 fases: **Fase cefálica:** A visão e o aroma disparam processos fisiológicos que antecipam a chegada do alimento. O sistema parassimpático e a divisão entérica do sistema nervoso autônomo são ativados, causando a secreção de saliva na boca e de suco gástrico no estômago; **Fase gástrica:** é quando o alimento é ingerido. **Fase de substrato:** é a fase onde o alimento é digerido e os nutrientes começam a ser absorvidos e chegam à corrente sanguínea (BEAR *et al.*, 2002). Em cada uma dessas fases há mecanismos específicos que atuam na regulação do comportamento alimentar.

O comportamento alimentar humano é regulado por duas vias: a homeostática e a hedônica (HARROLD *et al.*, 2012), a desregulação delas pode levar a distúrbios e patologias. O controle homeostático do apetite é mediado pela necessidade biológica de manutenção corporal dos depósitos de reservas energéticas (HARROLD *et al.*, 2012). Por outro lado, o

controle hedônico do apetite é mediado pelo prazer e sensação de recompensa envolvida no consumo de alimentos palatáveis.

Gordon Kennedy, em 1952, propôs a teoria lipostática postulando que o organismo monitora a quantidade de gordura corporal e preserva as reservas energéticas contra perturbações (tendência a manter o peso inicial), com o objetivo de manter a homeostase. Isso é um dos fatores que poderia explicar o porquê temos tanta dificuldade em perder peso, enquanto nosso organismo “luta” para manter o peso inicial (KENNEDY, 1952).

1.2.1 Regulação periférica do comportamento alimentar

Há fatores periféricos envolvidos na regulação do comportamento alimentar, eles tipicamente são liberados como consequência da ingesta alimentar (HARROLD *et al.*, 2012). Abordaremos a seguir os principais fatores periféricos.

1.2.1.1 Sinais de saciedade

Entre os fatores periféricos de regulação do comportamento alimentar estão os sinais de saciedade (HARROLD *et al.*, 2012, YOUNG, 2012). Os sinais de saciedade são gerados no trato gastrointestinal durante uma refeição, e regulam a ingestão alimentar induzindo a sensação de plenitude. Depois da entrada no lúmen gastrointestinal, os nutrientes provocam a secreção de vários peptídeos, além de estimular a atividade vagal e vias simpáticas aferentes para o núcleo do trato solitário (NTS), no tronco cerebral, que fornecem informações sobre propriedades dos nutrientes (WOODS, 2004). O núcleo do trato solitário (NTS) expressa os receptores de POMC e leptina, o que sugere que essa área cerebral, assim como o núcleo arqueado (ARC), é capaz de integrar sinais periféricos de saciedade e de adiposidade com a informação hipotalâmica (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Estes mesmos peptídeos também alcançam o rombencéfalo através da corrente sanguínea e interagem com os receptores locais. Os mais importantes sinais de saciedade são a colecistocinina (CCK), bombesina, glucagon, peptídeo semelhante ao glucagon tipos 1 e 2, apolipoproteína A-IV, amilina, somatostatina, enterostatina, e peptídeo YY (3-36) (PYY₃₋₃₆) (VALASSI *et al.*, 2008). O NTS também tem receptores de serotonina 5-HT₃ (5-hidroxitriptamina), monoamina relacionada ao controle do humor. A serotonina no NTS medial participa do controle do tamanho da refeição e medeia a ação da colecistocinina (CCK), induzindo supressão da ingestão alimentar (HAYES; COVASA, 2006).

1.2.1.2 Sinais de fome

A fase cefálica do controle do apetite se refere a respostas fisiológicas iniciadas pela visão ou cheiro da comida. Essa fase antecipatória prepara o sistema digestivo para começar a refeição. Respostas da fase cefálica ocorrem na boca (secreção antecipada da saliva), estômago e intestino. O contato principalmente químico, por exemplo, o gosto, e também estímulo físico, ex: sentir o alimento na boca (oleosidade, viscosidade) através de receptores na mucosa do nariz e boca, transmite sinais para o cérebro através de fibras aferentes primárias olfativas, gustativas e pares cranianos (1, 5, 7, 9 e 10) (HARROLD *et al.*, 2012).

Tem sido proposto que alterações na glicemia sanguínea poderiam fornecer um sinal para o início de uma nova refeição. Detecção de glicose ocorre centralmente em diferentes locais do rombencéfalo ao hipotálamo (LEVIN, 2002). Estas áreas do cérebro, juntamente com sensores de glicose periféricos, representam uma rede que controla a disponibilidade da glicose. A disponibilidade de glicose influencia a expressão e metabolismo de vários neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos (LEVIN, 2006; HARROLD *et al.*, 2012).

A redução da disponibilidade de glicose, ou o aumento da grelina circulante leva ao aumento no núcleo arqueado (ARC) de liberação de neuropeptídeo Y (NPY) que inibe a proopiomelanocortina (POMC). O hormônio estimulante da tireóide (TSH) e o hormônio liberador de corticotropina (CRH) estimulam a secreção de hipocretina/orexina e hormônio concentrador de melanina (MCH) do hipotálamo lateral para aumentar a ingestão alimentar e reduzir a taxa metabólica. O núcleo arqueado (ARC) é um órgão circunventricular, responde a uma grande variedade de hormônios, e parece orquestrar as respostas do cérebro às mudanças de demanda energética (CONE *et al.*, 2001).

A grelina é um hormônio que sinaliza a fome. É um hormônio periférico secretado pelas células oxínticas do estômago (VASSALI *et al.*, 2008). Este o único hormônio (conhecido até o momento) que estimula o comportamento alimentar (HARROLD *et al.*, 2012). Os receptores de grelina (GHS-R1a) estão localizados nos neurônios NPY e o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) (VASSALI *et al.*, 2008). O efeito orexigênico da grelina é talvez explicado pela estimulação de neurônios NPY no núcleo arqueado (HARROLD *et al.*, 2012). Um estudo mostrou que a administração de grelina central induz aumento da atividade locomotora, da liberação de dopamina no núcleo accumbens, sugerindo que a grelina poderia ativar o sistema dopaminérgico mesoaccumbal, sistema associado à recompensa e comportamentos motivados (JERLHAG *et al.*, 2006). Surpreendentemente, a dieta hiperlipídica pode inibir a hiperfagia causada pela liberação da

greлина (GARDINER *et al.*, 2010), esses achados mostram a grande influência que a dieta tem sobre o metabolismo do indivíduo.

1.2.1.3 Sinais de adiposidade

Sinais de adiposidade de acordo com Woods (2004) são hormônios secretados no sangue em proporção direta à quantidade de gordura corporal armazenada. Os mais conhecidos sinais de adiposidade são a insulina e a leptina.

A insulina é secretada pelas células pancreáticas β em respostas ao aumento de glicose. Entretanto, a insulina basal na ausência de níveis elevados de glicose, bem como o aumento da insulina acima do basal durante as refeições, é diretamente proporcional ao total de gordura corporal ou adiposidade (BAGDADE *et al.*, 1967; POLANSKY *et al.*, 1988). Indivíduos obesos apresentam maiores níveis de insulina basal e em resposta ao alimento comparado a indivíduos magros (POLANSKY *et al.*, 1988). Receptores de insulina e leptina são expressos pelos neurônios envolvidos no balanço energético, a administração de ambos os hormônios diretamente no cérebro diminui o a ingesta alimentar (SCHWARTZ *et al.*, 2000), ou seja, ambos são considerados hormônios anoréticos liberados durante o estado pós-prandial.

A leptina é secretada pelos adipócitos em proporção direta à quantidade de gordura corporal armazenada. A leptina sinaliza o núcleo arqueado (ARC) a modular o balanço energético e crescimento (WOODS *et al.*, 1998). A ativação destes neurônios leva a redução da atividade de neurônios NPY/AgPR e ativação de neurônios POMC. Conseqüentemente o α -hormônio estimulador de melanócito (α -MSH) se liga a receptores de melanocortina 3 e 4 (MC 3 e 4 respectivamente) em células do hormônio concentrador de melanina (MCH) no hipotálamo lateral para reduzir a ingestão alimentar e com o hormônio estimulante da tireóide (TSH) e o hormônio liberador da corticotropina (CRH) no núcleo paraventricular, aumentam o gasto energético (ABIZAID; HORVATH, 2008).

1.2.2 Regulação central do comportamento alimentar

1.2.2.1 Hipotálamo e o controle homeostático do apetite

O hipotálamo é o centro integrador dos comportamentos motivados; em relação ao comportamento alimentar, esta estrutura é responsável pela homeostasia orgânica e manutenção do peso corporal (WILLIAMS *et al.*, 2000). O hipotálamo lê, interpreta e integra

uma gama de sinais que descreve o estado nutricional do animal e seu ambiente externo, fazendo ajustes apropriados na ingestão alimentar, gasto de energia e metabolismo como resultado das informações recebidas (WILLIAMS *et al.*, 2000). Em mamíferos, o hipotálamo se divide em mais de 40 áreas e núcleos histologicamente distintos e muitos deles podem ser divididos ainda em subnúcleos. Entre eles estão:

O núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) está localizado na base do terceiro ventrículo bilateralmente e imediatamente acima da eminência mediana. A eminência mediana é um dos órgãos circumventriculares, regiões do sistema nervoso central que recebem sinais químicos e físico-químicos do organismo que orientam a sua função (LENT, 2010); nessas regiões a barreira hematoencefálica é permeável. O ARC contém populações de neurônios que expressam o gene do neuropeptídeo Y (NPY) juntamente com o peptídeo relacionado ao gene cutia (AgRP) e os neurônios que expressam o gene da proopiomelanocortina (POMC); a clivagem do mesmo forma o peptídeo anorético α -hormônio estimulador de melanócito (α -MSH) (WILLIAMS *et al.*, 2000; ABIZAID; HORVATH, 2008). A POMC atua sobre os receptores MC 3 e 4 presentes em vários núcleos hipotalâmicos, reduzindo o consumo alimentar e gasto de energia de um modo semelhante à leptina (BOSTON *et al.*, 1997). Os neurônios POMC sintetizam um segundo peptídeo anorético, o peptídeo relacionado à cocaína e anfetamina (CART) (ELIAS *et al.*, 2001). O ARC contém densa concentração de neurônios sensíveis à leptina, sendo aceito como região chave do balanço energético (ABIZAID; HORVATH, 2008). O neuropeptídeo Y (NPY) está implicado na manutenção do peso corporal e balanço energético (ABIZAID; HORVATH, 2008), sendo produzido no núcleo arqueado (ARC) e liberado no núcleo paraventricular (PVN). Quando administrado intraventricularmente, o NPY estimula o comportamento alimentar (BILLINGTON *et al.*, 1991), sendo um peptídeo orexigênico. Os neurônios NPY produzem também um segundo peptídeo orexigênico, o peptídeo relacionado ao gene cutia (AgRP), antagonista endógeno dos receptores MC3 e 4 (OLLMANN *et al.*, 1997). Neurônios NPY também expressam o ácido γ aminobutírico (GABA), neurotransmissor inibitório (PU *et al.*, 1999). O GABA inibe a POMC e a CART estimulando o comportamento alimentar (PU *et al.*, 1999, ABIZAID; HORVATH, 2008).

Há também o núcleo paraventricular (PVN), um local onde estão situadas numerosas vias neuronais implicadas no balanço energético, incluindo principalmente projeções de neurônios NPY do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) e outras projeções contendo orexinas. Lesões do núcleo ventromedial (VHM) ou do núcleo paraventricular (PVN)

produzem uma síndrome de hiperfagia e obesidade, mas não é inteiramente claro se as síndromes são devido ao dano aos neurônios ou às fibras que passam por essas regiões.

O núcleo ventromedial (VHM) foi identificado como alvo importante da leptina, onde ela atua inibindo a alimentação, estimulando o gasto de energia e causando perda de peso (WILLIAMS *et al.*, 2000; SATOH *et al.*, 1997).

O hipotálamo dorsomedial (DHM), tem extensivas conexões com outros núcleos hipotalâmicos mediais e o hipotálamo lateral, e acredita-se que tenha um papel integrador no processamento de informações a partir de populações neuronais desses sítios (ELMQUIST *et al.*, 1998).

O hipotálamo lateral (LHA) tem uma menor densidade de corpos celulares, expressando o hormônio concentrador de melanina (MCH) e as orexinas (hipocretinas). Também contém numerosos sistemas de fibras que se projetam para, e são originadas de estruturas do tronco cerebral responsáveis por várias funções viscerais, discriminação do paladar e distensão gástrica (núcleo do trato solitário e núcleo parabraquial) (BERNARDIS; BELLINGER, 1996; WILLIAMS *et al.*, 2000). O hipotálamo lateral (LHA) foi classicamente denominado “centro da fome”, abrangendo neurônios e terminais contendo peptídeos orexigênicos, e também neurônios sensíveis à glicose que são estimulados pela hipoglicemia (principalmente pelas vias ascendentes do tronco cerebral), sendo crucial na mediação da hiperfagia acentuada pela hipoglicemia (BERNARDIS; BELLINGER, 1996; WILLIAMS *et al.*, 2000). Por sua vez, o hipotálamo ventromedial (VHM) era conhecido como “centro da saciedade”, sendo que durante muitas décadas a hipótese dualista (centro da fome x centro da saciedade) foi dominante. No entanto, com o passar do tempo, os estudos evidenciaram outros mecanismos envolvidos na regulação do comportamento alimentar (ABIZAID; HORVATH, 2008). A parte perifornical do hipotálamo lateral (LHA) envolve o feixe longitudinal de fibras do fórnix, contendo alta densidade de receptores NPY (WILLIAMS *et al.*, 2000). As hipocretinas/orexinas se projetam para o núcleo arqueado (ARC), fazendo sinapse com as células NPY/AgRP, acredita-se que este circuito tenha um papel importante na ingestão de alimentos induzida pela hipocretina/ orexina (HORVARTH *et al.*, 1999).

1.2.2.2 Controle hedônico do apetite

Palatabilidade e prazer são sem dúvida o mais poderoso motivador da ingestão alimentar, a natureza do alimento compensador parece ser capaz de substituir o controle homeostático, agindo como um estímulo mesmo na ausência de déficit de energia (HARROLD *et al.*, 2012). O sistema endocanabinóide, os opióides (HARROLD *et al.*, 2012) e o sistema mesolímbico (VOLKOW *et al.*, 2011) estão envolvidos no controle hedônico do apetite. Em animais, antagonistas opióides parecem reduzir seletivamente a ingestão de alimentos hiperpalatáveis (COOPER, 1983). Os endocanabinóides possivelmente medeiam o desejo e o prazer pelos alimentos hiperpalatáveis (HARROLD *et al.*, 2012). A via mesolímbica é composta por neurônios dopaminérgicos na área tegmentar ventral (VTA) com projeções para o núcleo accumbens (NAC) e córtex pré-frontal (mPFC) (CORDEIRA; RIOS, 2011). Este circuito neural está envolvido com os efeitos comportamentais de drogas de abuso e recompensas naturais, tais como alimentos, o que provoca liberação de dopamina em alvos mesolímbicos (CORDEIRA; RIOS, 2011). Outras projeções dopaminérgicas também estão implicadas, incluindo o estriado dorsal (caudado e putâmen), córtex (orbitofrontal – OFC, giro cingulado - ACC), regiões límbicas (hipocampo e amígdala) e hipotálamo lateral (VOLKOW *et al.*, 2011). Aferências glutamatérgicas a neurônios dopaminérgicos de regiões envolvidas com percepção sensorial (ínsula ou córtex gustativo primário), homeostase (hipotálamo), recompensa (núcleo accumbens), emoção (amígdala e hipocampo), multimodal (córtex orbitofrontal – OFC) modulam sua atividade em resposta a recompensa e respostas condicionadas à comida (GEISLER, 2008).

A alimentação hedônica tipicamente envolve o consumo de energia densa, alimentos altamente palatáveis e tem sido associada à via dopaminérgica mesolímbica, um regulador de comportamentos motivados e busca por recompensa (CORDEIRA *et al.*, 2010). O “querer” e o “gostar” são dois estados envolvidos no comportamento alimentar hedônico (BERRIDGE, 2009). O “querer” é a motivação para algo, o impulso ou desejo de obter algo. O “gostar” é o componente hedônico do prazer. Às vezes, buscamos coisas sem necessariamente sentirmos prazer ao obtê-las (LENT, 2010). O sistema dopaminérgico estriatal é predominantemente implicado (embora não exclusivamente) no “querer”, os sistemas opióide e canabinóide são predominantemente (embora não exclusivamente) implicados no “gostar” (VOLKOW *et al.*, 2011).

Estudos de imagem identificaram quatro principais circuitos encefálicos relevantes na neurobiologia do abuso de drogas, vício e obesidade: 1) recompensa/saliência; 2) motivação;

3) aprendizado/condicionamento; 4) controle inibitório/ regulação emocional/ função executiva (VOLKOW *et al.*, 2008a). Foi proposto um modelo de obesidade que postula que durante a exposição ao reforçador ou para os sinais condicionados para o reforço, a recompensa esperada (processada pelo circuito de memória) resulta em superativação dos circuitos de recompensa e motivação, enquanto diminui a atividade no circuito de controle cognitivo. Isto contribui para a incapacidade para inibir a busca e consumo da droga (nos adictos) ou a comida (nos obesos), apesar da tentativa de fazê-lo. Os circuitos neurais controlados pela dopamina interagem um com o outro, e a interrupção de um circuito pode ser contraposto pela atividade do outro, o que explicaria por que um indivíduo pode ser menos capaz de exercer o controle sobre o seu comportamento em relação ao uso de drogas ou a comida, mais do que em outros tipos de comportamento (VOLKOW *et al.*, 2008a).

Como dito anteriormente, estudos mostraram a diminuição da sinalização de dopamina em regiões estriatais em obesos (GEIGER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2001). A diminuição da quantidade de receptores D2 tem sido relacionada à compulsão alimentar em ratos obesos (JOHNSON; KENNY, 2010) e a diminuição da atividade metabólica no córtex orbitofrontal (OFC) e giro cingulado (ACC) em humanos obesos (VOLKOW *et al.*, 2008b). Além disso, a diminuição da atividade da dopamina no VTA resulta em um dramático aumento no consumo de alimento hiperlipídico em camundongos (CORDEIRA *et al.*, 2010). A hipoatividade da via dopaminérgica mesolímbica tem sido sugerida como causa da síndrome da deficiência da recompensa, que se manifesta com a superperalimentação compensatória (CORDEIRA; RIOS, 2011). Indivíduos obesos, quando comparados a indivíduos magros, experimentaram menos ativação dos circuitos de recompensa do consumo real do alimento (recompensa consumatória), enquanto mostraram maior ativação de regiões corticais somatossensoriais que processam a palatabilidade quando antecipam o consumo (STICE *et al.*, 2008a). Ou seja, há uma desregulação nos mecanismos de recompensa entre o que é realmente ingerido e o que é esperado. Um aumento da atividade das regiões relacionadas à palatabilidade poderia levar indivíduos obesos à superalimentação ou uso de outros reforçadores naturais, enquanto a ativação dopaminérgica reduzida pelo consumo real de alimentos poderia levar ao superconsumo como uma maneira de compensar a fraca sinalização de dopamina (STICE *et al.*, 2008b). É proposto que situações nas quais existe uma incompatibilidade entre a recompensa esperada e a recompensa obtida promovem compulsão alimentar como uma tentativa de atingir o nível esperado de recompensa. (VOLKOW *et al.*, 2011).

Mecanismos neuronais que regulam a recompensa/hedonia e o metabolismo energético modulam o comportamento alimentar. Sinais periféricos que regulam sinais da

fome homeostática parecem aumentar a sensibilidade de regiões límbicas ao estímulo da comida quando eles são orexígenos (grelina) e diminuem a sensibilidade à ativação quando eles são anorexígenos (leptina e insulina). A desregulação entre os mecanismos homeostáticos e hedônicos pode levar à superalimentação a contribuir para o desenvolvimento da obesidade (VOLKOW *et al.*, 2011).

Existem evidências que a obesidade está associada a disfunções cognitivas, assim como desregulação nas funções executivas, atenção e memória (VOLKOW *et al.*, 2011). Impulsividade, déficit de atenção e hiperatividade são fatores de risco para a obesidade (DAVIS, 2009). Sujeitos impulsivos apresentam tomada de decisão pouco adequada. Existem muitas similaridades entre superalimentação e abuso de drogas, ambos ativam os mesmos sistemas de recompensa. Indivíduos adictos em drogas usam-na como automedicação para impulsionar um sistema de recompensa lento ou hipo-funcional, essa desregulação é conhecida como síndrome da recompensa deficiente. Os mesmos mecanismos acontecem na superalimentação. O polimorfismo *Ankyrincontaining kinase 1* (ANKK1), gene vizinho à *d2r2*, está associado com essa deficiência. Não se sabe como este marcador influencia a expressão de *d2rd2* ou se o gene ANKK1 é biologicamente ligado à função *d2rd2*. É sugerido que indivíduos com alelo Taq1A+ (genótipos A1/A1 e A1/A2) têm uma redução no número de receptores D2, diminuindo a sinalização de dopamina com conseqüente hipo-resposta a recompensa (DAVIS, 2009). Alzheimer e outras demências também contribuem para a vulnerabilidade à obesidade (VOLKOW *et al.*, 2011). O papel da dopamina no controle inibitório é bem reconhecido e a sua perturbação pode contribuir para distúrbios comportamentais de descontrole, tais como a obesidade. Uma correlação negativa entre IMC e o receptor D2 estriatal foi relatada em obesos (WANG *et al.*, 2001), bem como em indivíduos com sobrepeso (HALTIA *et al.*, 2007).

1.2.2.3 O papel da leptina e do BDNF na regulação do comportamento alimentar

A leptina, produto do gene *ob*, é produzida principalmente no tecido adiposo, está presente no plasma, e chega ao cérebro via corrente sanguínea. Ela é produzida também em outros locais como o tecido adiposo marrom, epitélio gástrico, osteoblastos, epitélio mamário, placenta, fígado, coração, células dos folículos capilares; é provável que em alguns dessas regiões o alvo seja local, ou seja, parácrino e não endócrino (SOUSA *et al.*, 2009). A leptina, a longo prazo, controla a adiposidade e regula alterações metabólicas em resposta a mudanças

nutricionais (VASSALI *et al.*, 2008). Os receptores de leptina são encontrados na forma longa (*OB-R1*) e curta (*OB-Rs*). A forma longa é encontrada em várias regiões do cérebro e a forma curta nos demais tecidos (adiposo, gástrico, gônadas, placenta...).

A ativação do receptor ObRb pela leptina e a conseqüente transcrição gênica pode ocorrer por três cascatas de sinalização, que incluem a ativação do JAK2/STAT3, a ERK/MAP quinase e a fosfoinositol 3-cinase (PI3K) (SAHU, 2004). A ação da leptina no seu receptor associado ao JAK2 fosforila o STAT3 intracelular que, por sua vez, irá atuar como um fator de transcrição de diversos genes, incluindo o gene supressor da sinalização de citocinas-3 (SOCS3), que produz uma proteína intracelular que impede a ativação adicional da ObRb (SAHU, 2004). O papel fundamental dos STAT3 como um fator de transcrição que medeia os efeitos da leptina no balanço energético tem se destacado recentemente pela geração de camundongos com deleções em diferentes sítios para a fosforilação de STAT3, tornando os animais com sinalização STAT3 deficiente. Esses camundongos são gravemente obesos e resistentes à insulina, e mostram alta expressão da NPY/AgRP e expressão diminuída de POMC no ARC (GAO *et al.*, 2004; BATES *et al.*, 2003). A resistência central à leptina pode ocorrer devido à hiperleptinemia, um extenso período de exposição hipotalâmica a altos níveis desse hormônio pode levar ao desenvolvimento de resistência central à leptina (SAHU, 2004).

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é um membro da família das neurotrofinas, juntamente com o fator do crescimento nervoso (NGF), neurotrofina-3, neurotrofina-4. É expresso durante o desenvolvimento e em sinapses excitatórias em neurônios imaturos. Inicialmente, foi identificado como um fator de crescimento auxiliando a sobrevivência de neurônios sensoriais (CORDEIRA; RIOS, 2011). O BDNF e seu receptor TrkB (receptor tirosina quinase B) medeiam à sobrevivência neuronal, diferenciação e plasticidade e promovem saciedade através de mecanismos centrais (CORDEIRA *et al.*, 2010).

O BDNF influencia na alimentação hedônica; seu receptor TrkB é expresso em células dopaminérgicas do VTA, córtex pré-frontal (mPFC) e em neurônios GABAérgicos de projeção no NAC (FREEMAN *et al.*, 2003) sugerindo que, nessas regiões, o BDNF possa atuar nos mecanismos de recompensa. Estudos farmacológicos mostram que a depleção de BDNF no VTA leva a defeitos na transmissão dopaminérgica e aumento do consumo de dieta hiperlipídica e aumento do peso corporal (CORDEIRA *et al.*, 2010). O efeito dieta-específico de deleção de BDNF no VTA pela exposição crônica à dieta rica em gordura sugere que a sinalização de BDNF no sistema mesolímbico é essencial para a regulação hedônica, mas não

para a regulação homeostática do comportamento alimentar. Os mecanismos que levam a redução da secreção de dopamina no mesolímbico em animais mutantes (deficientes em BDNF) ainda não são claros (CORDEIRA; RIOS, 2011). O BDNF poderia atuar pré-sinápticamente modulando a produção de dopamina em células do VTA, e a expressão de BDNF e TrkB no VTA pode ser influenciada pelo consumo de dieta hiperlipídica (CORDEIRA *et al.*, 2010; CORDEIRA; RIOS, 2011). A via dopaminérgica mesolímbica tem sido relacionada a desordens alimentares envolvendo compulsão alimentar, o BDNF é um modulador crítico dessa via (CORDEIRA; RIOS, 2011). Interessantemente, o polimorfismo funcional *Bdnf Val66Met* tem sido relacionado à suscetibilidade de obesidade em humanos (SKLEDAR *et al.*, 2012, BECKERS *et al.*, 2008, OOI *et al.*, 2012).

O BDNF é sintetizado em várias áreas do hipotálamo incluindo o hipotálamo ventromedial (VMH), hipotálamo dorsomedial, hipotálamo lateral e núcleo paraventricular (PVN); além disso, o TrkB é amplamente expresso em todo o hipotálamo (OOI *et al.*, 2012). Não é claro o papel do BDNF em todas as áreas hipotalâmicas, parecendo modular os mecanismos homeostáticos. O BDNF tem um papel crítico no controle alimentar homeostático, mas não é essencial na regulação do gasto energético, uma vez que há outros mecanismos envolvidos nessa regulação (CORDEIRA; RIOS, 2011).

Vários estudos mostram o papel do BDNF no controle do comportamento alimentar (revisado em CORDEIRA; RIOS, 2011). Camundongos com deleção de BDNF apresentaram aumento dramático do peso corporal (80- 150%), aumento dos níveis de ansiedade, hiperleptinemia, hiperinsulinemia, hiperglicemia, hipercolesterolemia (RIOS *et al.*, 2001). A injeção aguda de BDNF intracerebroventricular (ICV) no hipotálamo ventromedial reduz o peso corporal e diminui o consumo de ração padrão. A administração crônica de BDNF intracerebroventricular (ICV) no hipotálamo ventromedial reduz o peso corporal e adiposidade dos grupos de animais que receberam dieta hiperlipídica (GODAR *et al.*, 2011). Animais mutantes (deficientes em BDNF) apresentam hiperfagia, com o aumento do número de refeições, mas não o tamanho das mesmas (FOX; BYERLY, 2004). A infusão central de BDNF em ratos resulta em supressão do apetite e perda de peso ou atenuação do ganho de peso (PELLEYMOUNTER *et al.*, 1995). Animais heterozigotos nocaute com redução do BDNF disponível apresentam hiperfagia e obesidade (FOX; BYERLY, 2004, LYONS *et al.*, 1999). Infusão de BDNF no complexo dorsal vagal (DVC), uma área do rombencéfalo que recebe vários sinais de estado energético e atua através dos nervos vagais aferentes resulta na diminuição da ingestão calórica e perda de peso (BARIOHAY *et al.*, 2009).

Pesquisas com humanos mostraram a importância do BDNF na regulação do comportamento alimentar. Foi relatada a existência de correlação positiva entre os níveis de BDNF e índice de massa corporal (IMC), sugerindo que mudanças na concentração de BDNF circulante são secundárias à desregulação do balanço energético (SUWA *et al.*, 2006). No entanto, a restrição calórica em indivíduos com sobrepeso foi significativamente associada com redução de IMC e aumento dos níveis séricos de BDNF, indicando uma correlação negativa entre BDNF e peso corporal (ARAYA *et al.*, 2008). Vários estudos têm mostrado a ligação do polimorfismo funcional *Bdnf Val66Met* à suscetibilidade de obesidade em humanos (SKLEDAR *et al.*, 2012, BECKERS *et al.*, 2008, OOI *et al.*, 2012). Vários polimorfismos de BDNF têm sido identificados em humanos. Uma variante funcional que tem atraído interesse considerável é o polimorfismo *Bdnf Val66Met*, caracterizado pela substituição de uma valina (Val) por uma metionina (Met) no códon 66, diminuindo o transporte intracelular e a secreção atividade-dependente do BDNF (CHEN *et al.*, 2006). Há vários estudos relacionando o alelo Met ao possível papel do BDNF em diversos transtornos psiquiátricos, incluindo transtornos de humor (SEARS *et al.*, 2011) e de ansiedade (MOLLE *et al.*, 2012), distúrbios psicóticos (BUCKLEY *et al.*, 2011) e distúrbios alimentares (MONTELEONE *et al.*, 2006; RIBASES *et al.*, 2004).

Ooi *et al* (2012) propõem um modelo de superalimentação e obesidade baseado no BDNF. O polimorfismo *Bdnf Val66Met* diminui a atividade do BDNF, o que poderia influenciar o comportamento alimentar de duas formas: a primeira é a via direta, relacionada ao papel específico do BDNF como mediador do controle do consumo alimentar em áreas ricas em receptores de BDNF, incluindo o hipotálamo e o rombencéfalo. A baixa atividade de BDNF nestas áreas é relacionada à diminuição da promoção de saciedade e efeitos hipoglicemiantes embotados/diminuídos em vários centros cerebrais envolvendo a regulação do balanço energético; a segunda via seria indireta, na qual se consideraria o papel do BDNF atuando sobre os sistemas monoaminérgicos (serotonina e dopamina). Os baixos níveis de BDNF nessas áreas poderiam influenciar na atividade de serotonina e dopamina, diminuindo os níveis das mesmas. Essas monoaminas têm o papel relevante a vários comportamentos relacionados à ingesta alimentar, tais como impulsividade, humor, ansiedade e recompensa. Essa via pode explicar a superalimentação e obesidade relacionadas a distúrbios psiquiátricos, incluindo transtorno de humor, transtorno do déficit de atenção, e/ou compulsão alimentar (OOI *et al.*, 2012).

O hipocampo, uma importante área ligada à memória e aprendizagem, tem sido relacionado ao aprendizado da inibição de comportamentos apetitivos (TRACY *et al.*, 2001).

Sugere-se que a expressão diminuída de BDNF no hipocampo poderia resultar em um menor controle inibitório da ingestão de dieta hiperlipídica, aumentando o risco para o desenvolvimento de obesidade (OOI *et al.*, 2012).

O BDNF parece ter um papel também no controle glicêmico. A administração de glicose resulta em aumento da expressão gênica de BDNF e transcrição de TrkB no hipotálamo ventromedial (VMH) do rato, enquanto os níveis de expressão gênica de BDNF diminuem com o jejum no hipotálamo ventromedial (VMH) e núcleo do trato solitário, uma área do rombencéfalo que recebe informações aferentes do paladar assim como sinais de aferências viscerais (UNGER *et al.*, 2007).

Conforme revisado em Cordeira e Rios (2011), o complexo vagal dorsal (DVC) é localizado no tronco cerebral caudal e compreende a área postrema, o núcleo do trato solitário (NTS) e o núcleo dorsal motor do vago. Tal como o hipotálamo, ele integra os sinais do estado de energia provenientes da periferia transmitidos via aferências vagais, incluindo o peptídeo anorexigênico gastrointestinal colecistocinina (CCK). O DCV tem uma alta densidade de receptores MC4 e é um importante sítio de sinalização de melancortina. Além disso, corpos celulares e fibras contendo BDNF estão presentes no núcleo do trato solitário (NTS) e área postrema (CONNER *et al.*, 1997). Os níveis da proteína BDNF no complexo vagal dorsal (DVC) estão reduzidos no jejum e aumentam com a realimentação (BARIOHAY *et al.*, 2005). A estimulação do receptor MC4 e administração sistêmica de leptina e colecistocinina (CCK) elevam os níveis proteicos de BDNF no complexo vagal dorsal (DVC) (BARIOHAY *et al.*, 2005). A infusão de BDNF no complexo vagal dorsal (DVC) promove a redução de ingestão alimentar e peso corporal (BARIOHAY *et al.*, 2005). Dados da literatura sugerem que BDNF facilita os efeitos supressores de apetite da melanocortina no complexo vagal dorsal (DVC). Portanto o complexo vagal dorsal (DVC) é um importante alvo para a ação de BDNF, facilitando seu efeito inibitório sobre o comportamento alimentar (CORDEIRA; RIOS, 2011).

O BDNF interage com a leptina, modulando a sinalização da melanocortina e levando à redução da ingestão (SPAETH *et al.*, 2012). Leptina aumenta a expressão de BDNF no complexo vagal dorsal (DVC) (SPAETH *et al.*, 2012). BDNF e TrkB modulam o balanço energético no núcleo do trato solitário contribuindo na mediação dos efeitos inibitórios da leptina no rombencéfalo (SPAETH *et al.*, 2012). A injeção intraventricular de BDNF leva os animais à perda de peso, diminuição do tamanho da refeição, mas não do número de refeições (SPAETH *et al.*, 2012).

2 HIPÓTESE

A exposição às dietas hipoproteica ou hiperlipídica pode alterar o perfil metabólico, afetando o comportamento alimentar (homeostático) e o consumo de alimento palatável (hedônico) possivelmente por modulação diferencial do BDNF sobre sistemas envolvidos na regulação destes comportamentos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral: Verificar o efeito de diferentes dietas sobre a modulação do comportamento alimentar em vias homeostáticas e hedônicas em ratas fêmeas.

3.2 Objetivos específicos:

1. Comparar o efeito da exposição crônica a 3 diferentes tipos de dietas (hipoproteica, hiperlipídica e controle) sobre o comportamento alimentar, metabolismo e resistência central à leptina;
2. Analisar o consumo basal destas 3 dietas, assim como o consumo agudo do alimento palatável, através de um sistema computadorizado de mensuração episódica (BioDAQ®);
3. Avaliar a adiposidade através da mensuração da gordura abdominal total;
4. Avaliar a os níveis de STAT e pSTAT no hipotálamo após esta exposição;
5. Avaliar os níveis de TH e pTH no núcleo accumbens após esta exposição;
6. Avaliar a os níveis de BDNF no núcleo do trato solitário (NTS), área tegmentar ventral (VTA) e soro destes animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Método geral

4.1.1 Animais experimentais e exposição crônica as dietas

O local onde foi realizado o estudo foi a Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA). Ratas fêmeas foram selecionadas ao acaso, sendo provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Elas permaneceram, individualmente, em caixas-moradia, confeccionadas em *Plexiglas*, medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de maravalha e foram mantidas em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12 horas, temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, limpeza das caixas uma vez por semana, ração padrão e água *ad libitum* por pelo menos 14 dias, antes de qualquer procedimento experimental. Após esse período (aos 90 dias de vida), as ratas foram randomizadas pelo peso corporal, mantidas individualmente e passaram a receber: 1) **dieta controle** contendo 22% de proteína e 4% de lipídios ou 2) **dieta hipoproteica** contendo 8% de proteína ou 3) **dieta hiperlipídica** contendo 45% de lipídios (PragSoluções Biociências). As ratas receberam as dietas *ad libitum* durante 5 semanas, sendo o consumo medido nas primeiras 24 horas de exposição e a cada 72 horas. O peso corporal foi medido semanalmente. Para os testes de preferência alimentar foi usada uma **dieta hipersacarídica** contendo 34% lipídios, 14% proteína, 30,2% carboidrato (sendo 20% em sacarose) (PragSoluções Biociências) e o Froot Loops® (Kellogg's). O estudo foi dividido em duas partes. Na primeira parte, os animais foram divididos em grupos, sendo cada grupo exposto a cada uma das 3 dietas durante 5 semanas (indução de alterações metabólicas pela dieta); após este período, todos os animais foram expostos agudamente ao alimento doce (avaliação de consumo de doce em grupos com diferentes perfis metabólicos) e logo após houve a morte por decapitação (coleta de tecidos após provocação aguda com alimento doce). Na segunda parte do estudo, cada um dos 3 grupos foi exposto a sua respectiva dieta durante 5 semanas, sendo em seguida colocados por 1 semana no BioDAQ® para avaliação do consumo basal de cada uma das dietas; posteriormente houve um teste de preferência alimentar (dieta *versus* alimento hiperpalatável por 20h) e uma semana após ao teste esses animais foram mortos por decapitação para coleta de tecidos.

Desenho Experimental

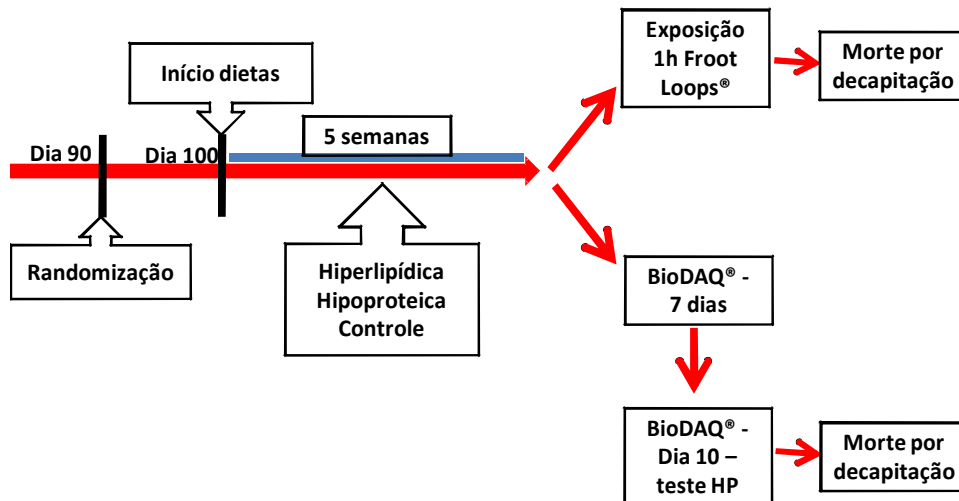


Figura 1: Desenho experimental do estudo.

4.1.2 Coleta de sangue e dissecação de estruturas e tecidos

Os animais foram decapitados em períodos diferentes. Na primeira parte do estudo, eles foram mortos logo após o consumo agudo de alimento doce (1h de exposição ao Froot Loops®). Na segunda parte do estudo, os animais foram decapitados uma semana após o teste de preferência alimentar (após 4 horas de jejum). Após a decapitação o sangue do tronco foi coletado em tubos. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 4000 RPM por 10 minutos a 4°C, o soro foi separado em alíquotas e armazenado a - 20°C para a posterior análise. Após a decapitação, o cérebro, fígado e músculo foram rapidamente removidos e congelados, através de imersão no isopentano, e armazenados a -80°C. Posteriormente, os cérebros foram descongelados até -20°C e foram realizados *punches* das áreas cerebrais de interesse (área tegmentar ventral, núcleo accumbens, hipotálamo (mediobasal), núcleo do trato solitário). O tamanho dos *punches* foi de 500 µm (e, dependendo da estrutura, se tirou

de 1 a 3 *punches*). Os cortes e punches foram realizados manualmente, com o auxílio de um atlas da estrutura cerebral do rato (PAXINOS; WATSON, 2007).

As duas porções da gordura abdominal (retroperitoneal e gonadal) foram dissecadas e pesadas utilizando uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g. Os resultados foram utilizados como parâmetro de obesidade abdominal (da SILVA BENETTI *et al.*, 2007, 2010).

4.1.3 Rotinas/normas de segurança e descarte dos rejeitos

Os pesquisadores fizeram uso de jaleco, luvas, toucas e propés durante a permanência na Unidade de Experimentação Animal, onde o projeto foi desenvolvido. Da mesma forma, utilizaram os equipamentos de proteção individual (EPI) visando à segurança do pesquisador nos laboratórios, respeitando as normas de segurança vigentes.

O manuseio e o descarte de solventes e reagentes foram realizados conforme as rotinas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O descarte dos animais também seguiu a rotina do HCPA: após a morte dos animais por decapitação, as carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos de cor branca, próprios para descarte, e armazenadas em freezer a -18°C . Em seguida o material foi encaminhado ao Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para processamento de acordo com o procedimento local.

4.2 Experimentos comportamentais

4.2.1 Teste de exposição aguda ao alimento doce - exposição 1 hora ao Froot Loops®

Na primeira parte do estudo, os animais ao término das cinco semanas de exposição às dietas, foram habituadas ao alimento doce/hiperpalatável (Froot Loops®) durante 4 dias na caixa moradia, recebendo 4 unidades por dia sem restrição alimentar.

No dia da exposição aguda, as ratas foram mantidas em jejum durante 4 horas após o início do ciclo claro, recebendo água *ad libitum*. Em seguida foram expostas ao alimento doce, previamente pesado, por 1 hora. O consumo foi medido imediatamente ao fim de 1h, assim como o peso corporal, e as ratas foram decapitadas imediatamente após esta exposição.

4.2.2 Consumo episódico

Para avaliação do consumo episódico, os grupos de animais que receberam cada uma das dietas por 5 semanas tiveram o consumo destas dietas mensurado através de um sistema computadorizado de mensuração episódica (BioDAQ® Food intake monitoring system, Research Diets), que consiste em balanças conectadas a comedouros (recipiente onde fica armazenada a ração) acopladas à caixa moradia ligada a uma central de dados e finalmente a um computador periférico. As caixas moradia eram transparentes (as ratas haviam sido habituadas a este tipo de caixa antes da exposição ao BioDAQ®), contendo cada uma 2 comedouros conectados. As ratas permaneceram individualmente nesse sistema durante 7 dias, cada grupo recebendo a sua respectiva dieta nos dois comedouros. No dia 10, um dos comedouros foi repleto com dieta hipersacarídica (HP) para realização do teste de preferência alimentar, que durou 20 horas. Uma semana após o teste de preferência alimentar houve a decapitação para coleta de tecidos. Para a análise dos resultados, o período do dia 1 ao dia 3 foi considerado como habituação ao BioDAQ®, e o período do dia 4 ao 7 foi considerado como a análise propriamente dita do comportamento alimentar no BioDAQ®. O BioDAQ® registra a cada segundo variações de peso na balança (acurácia 0,01 grama) sendo o consumo calculado através de um computador periférico. Cada vez que havia uma variação na balança igual ou maior do que 0,1 gramas com um intervalo entre o consumo igual ou inferior a 5 segundos era considerado um “*bout*”, ou **porção**. A porção é a menor unidade de alimentação quantificada, sendo definida como mordidas ininterruptas, ou com um intervalo inferior a 5 segundos entre elas. Um grupo de porções precedido e sucedido de um intervalo igual ou maior que 15 minutos, é definido como uma **refeição**. Os dados mensurados no BioDAQ® foram posteriormente exportados para o Microsoft EXCEL (Microsoft®) onde foram feitas as análises. Os filtros usados no BioDAQ® para a habituação e a análise do comportamento alimentar foram *reset period: none* (para o teste de preferência), *time of day 2* (para analisar os diferentes ciclos, tanto do teste de preferência alimentar quanto do BioDAQ® basal, com a hora de início 07:00); *bout filter: 4 (max) e 0,00 (min) include e 0,1 (max) e -0,1 (min) exclude; mean filter: 900 (IMI em segundos) e 0,1 (min)*; hora de início e fim das análises: 7 horas (para análises da habituação e análise do comportamento alimentar) ou de acordo com o período de interesse. Para tabulação dos dados foram utilizadas as tabelas *PSC total* (dados gerais), *meals* (para analisar o intervalo entre refeições – *post meal interval*), *group period average* (mostra os animais divididos por grupo, de acordo com as balanças de interesse). Para o cálculo do *post meal interval*, número de porções, número de refeições e saciedade

durante a habituação e análise do BioDAQ®, foi feito um cálculo (Microsoft EXCEL – Microsoft, contando com o suporte técnico da Research Diets) que permitiu que as duas balanças se combinassem temporalmente, se tornando teoricamente uma única balança, permitindo a análise desses resultados. Diariamente foi feita a manutenção e limpeza do sistema, onde era reposta a respectiva ração (KOWALSKI *et al.*, 2004).

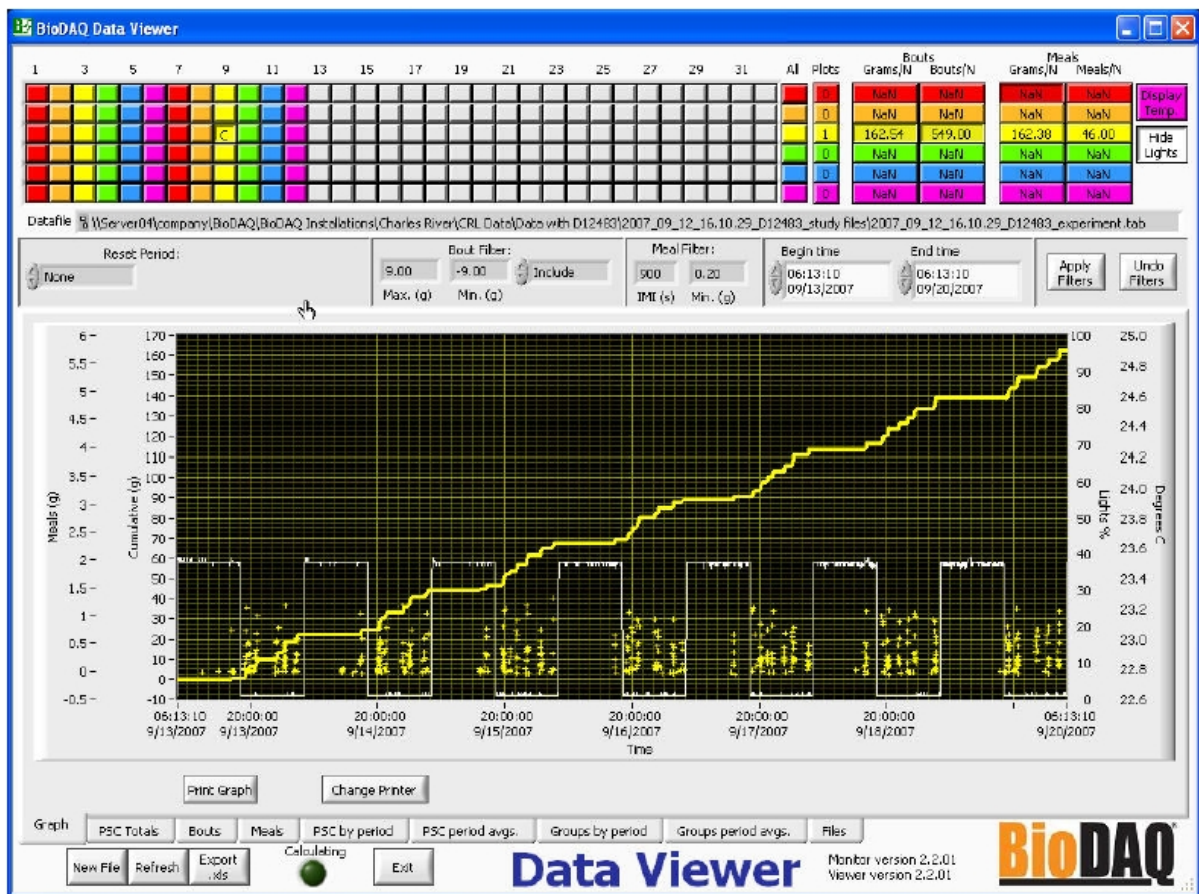


Figura 2: Dados do consumo dos animais processados pela central do BioDAQ® e abertos no computador com o programa *Data Viewer*.

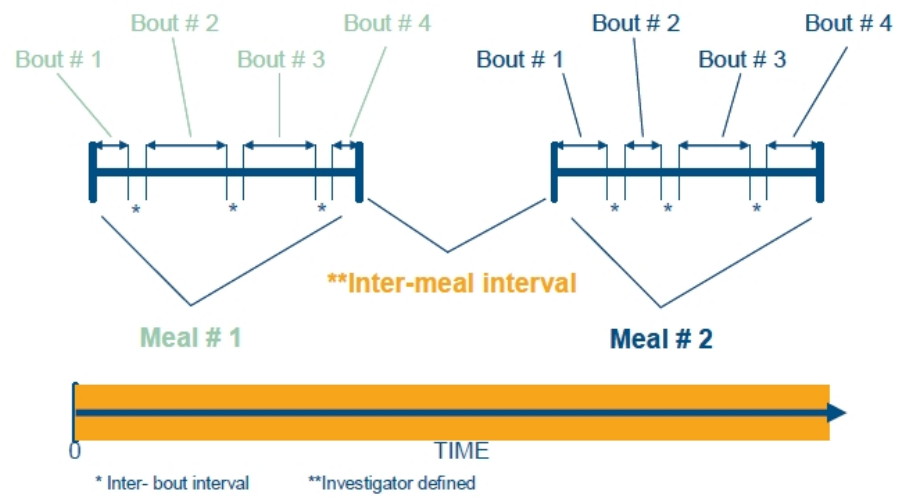


Figura 3: Esquema ilustrando a diferença entre refeições (*meals*) e porções (*bouts*) do BioDAQ®.

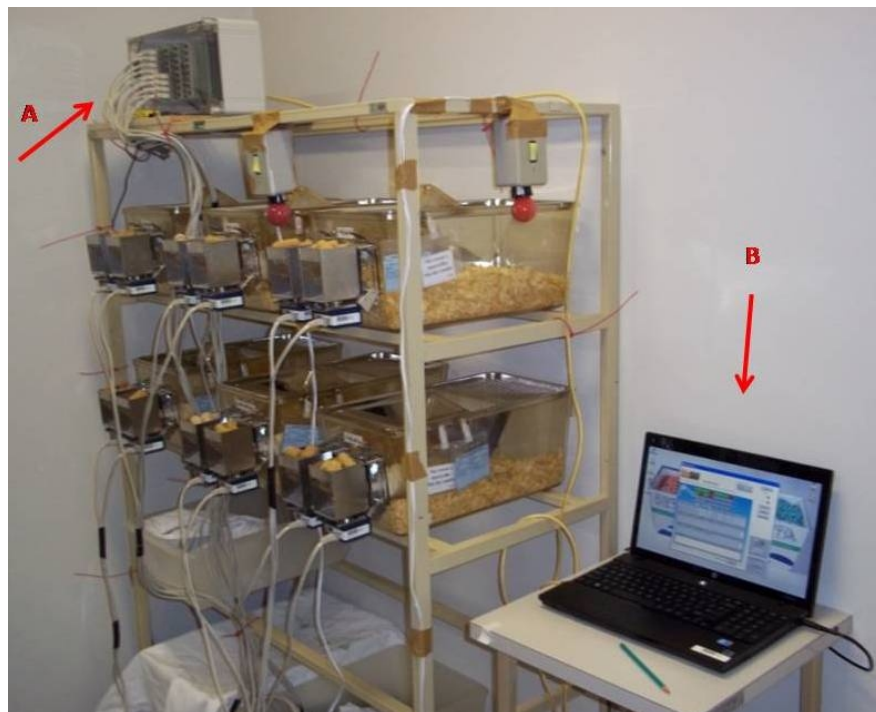


Figura 4: Vista do BioDAQ®. Cada caixa em que o animal se encontra está conectada a uma central (A) que envia as informações diretamente ao computador (B).



Figura 5: Vista do BioDAQ®. Balanças e comedouros conectados à caixa moradia.



Figura 6: Vista do BioDAQ®. Teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica. No primeiro comedouro ficava a dieta que eles receberam durante as 5 semanas, no segundo comedouro ficava a dieta hipersacarídica.

4.3 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Neurobiologia do Estresse (Departamento de Bioquímica UFRGS), Laboratório de Pediatria Translacional (Hospital de Clínicas de Porto Alegre) e Laboratório de Psiquiatria Molecular (Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

4.3.1 Medidas periféricas

4.3.1.1 Medida da glicemia no soro

Os níveis de glicose no soro foram mensurados através de método enzimático colorimétrico, kit Glicemia Enzimática Wiener lab. Utilizamos o soro, pipetamos 5 μ L de amostra. Para a curva padrão utilizamos o padrão standard: 5 μ L/ 10 μ L (P5 e P10). No branco pipetamos apenas 290 μ L de reativo de trabalho. Pipetamos 290 μ L reativo de trabalho em todos os poços, homogeneizamos. Incubamos por 5 min a 37°C. Foi feita a leitura do resultado com o espectrofotômetro a 505 nm.

4.3.1.2 Quantificação de BDNF por ELISA no soro e estruturas

Os níveis séricos de BDNF no soro foram analisados usando o Kit comercial ChemiKine TM BDNF Sandwich ELISA (Millipore, USA), conforme orientações do fabricante. Resumidamente, as amostras de soro foram inicialmente diluídas 1:50 com tampão de diluição, seguido de incubação por 12 horas em placas de 96 poços previamente sensibilizadas com anticorpo anti-BDNF humano. Já as amostras de tecido foram inicialmente homogeneizadas com tampão PBS, adicionando coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, cat: P8340). Cada pedaço de tecido foi homogeneizado em 250 μ L de tampão com micropistilos, seguido de centrifugação por 3000 RPM por 10min e coleta do sobrenadante. O sobrenadante foi diluído 1:2 com tampão de diluição. Às mesmas placas foi adicionada uma curva padrão com diluições seriadas 1:2 de BDNF com valores de 7,8 a 500 pg/ml. Ao término da incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem, seguido da adição de 100 μ L de anticorpo monoclonal de camundongo anti-BDNF humano biotilado diluído 1:1000 em tampão de diluição e incubação por 3 horas a temperatura ambiente. Após uma segunda lavagem, 100 μ L de estreptavidina conjugada a peroxidase (HRP) diluída

1:1000 foram adicionados aos poços, seguido de incubação a temperatura ambiente por 1h. Após uma nova lavagem, adição do substrato e solução de parada da reação colorimétrica, a quantidade de BDNF foi determinada por espectrofotometria a 450nm. A curva padrão representou uma relação direta entre a densidade óptica (OD) e a concentração de BDNF. Os níveis proteicos totais nas amostras de tecido, para os quais os valores de BDNF foram posteriormente corrigidos, foram medidos pelo método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina como padrão. (ELFVING *et al*, 2009).

4.3.2 Medidas centrais

4.3.2.1 Western blotting

O material que foi quantificado foi extraído através de “*punches*” (Paxinos; Watson, 2007). A proteína foi quantificada através de método colorimétrico (Pierce* BCA* Protein Assay, cat: 23225, Thermo Scientific) sendo feita a leitura do resultado com o espectrofotômetro a 592nm. Após foi realizada a extração citosólica, as amostras incubadas com LDS e DTT a 95 °C por 3min. As amostras já processadas foram pipetadas nos poços do gel NUPAGE 4-12% bis-tris gel (Bis-Tris-HCl buffer (pH 6.4), Acrylamide, Bis-acrylamide, APS, Ultrapure water) (INVITROGEN, cat: NP0323BOX) em um dos poços foi pipetado o marcador de proteína (Magic Mark XP western protein standard 20-220 Kda, INVITROGEN, cat: LC5602) foi colocado na cuba de eletroforese um tampão de corrida (NUPAGE MES SOS running buffer 20x, INVITROGEN, cat: np002) e ao mesmo foi adicionado um antioxidante (Nupage antioxidant, INVITROGEN, cat: np005). A cuba de eletroforese foi conectada a uma fonte de eletroforese, a corrida foi 1:30h, 120V, 100mA. Após a corrida abrimos o recipiente no qual estava o gel, colocamos o mesmo juntamente com esponjas embebidas em tampão de transferência (NUPAGE transfer buffer 20 x, INVITROGEN, cat: np006) dentro de um compartimento de transferência. Colocamos seqüencialmente as esponjas, o papel filtro, o gel, a membrana (hybond-C Amersham biosciences nitrocelulose 0,4 micron 30 cm x 3 m roll, GE heathcare, cat: RPN303C), o papel filtro, esponjas, fechamos o compartimento e colocamos dentro da cuba de transferência. Foi colocado na cuba de transferência o tampão de transferência e adicionado o antioxidante, a corrida foi 1:30h, 30V, 400mA. Após a transferência foi colocado Ponceau solution (Sigma-Aldrich, cat: P7170-1L) na membrana para ver se as proteínas foram transferidas. A membrana foi incubada em ambiente por 1 hora com leite em pó desnatado + TBS-T, para bloquear a mesma, esse

processo impede que ocorram interações não específicas entre a membrana e o anticorpo usado para a detecção da proteína alvo. A membrana ficou em incubação “*overnight*” na câmara fria com o anticorpo primário, no dia seguinte foi incubada por 2 horas com o anticorpo secundário. O anticorpo secundário se liga no primário. Mais comumente, uma peroxidase – ligada secundariamente é usada em conjunção com um agente quimiluminescente, e a reação produz fluorescência proporcionalmente à quantidade de proteína. Após esse processo foi realizada a revelação na câmara escura, foi colocado na membrana ECL (ECL western blotting analysis system, GE healthcare, cat: RNP 2106) e a mesma foi exposta ao filme fotográfico (KODAK). Para se obter a quantificação de uma proteína padrão, a membrana posteriormente foi incubada com uma proteína (α -tubulina, peso molecular: 50 KDa, Sigma-Aldrich, cat: T6074) em “*overnight*” na câmara fria, no dia seguinte incubada com o seu respectivo anticorpo secundário (AmershamECL Anti-Mouse IgG, GE healthcare, cat: NA 931) e revelada. A quantidade de proteína é calculada através do software Image J® (SRINIVASAN; DUNN, 2011; KURIEN; HAL SCOFIELD, 2006; CORDEIRA *et al.*, 2010). Para dosagem de tirosina hidroxilase (TH) e fosfo-tirosina hidroxilase (pTH) no núcleo accumbens foi utilizada concentração protéica de 20 μ g, foram usados os anticorpos primários: TH (1:5000) (anti-tyrosine hydroxilase, peso molecular: 60 KDa, Sigma-Aldrich, cat: T2928), pTH (1:500) (anti-phospho tyrosine hydroxilase, peso molecular: 60 KDa, INVITROGEN, cat: 368600) e tubulina (1:500) (α -tubulina, Sigma, cat: T6074). Os anticorpos secundários: *anti-mouse* (1:2000) (Amersham ECL Anti-Mouse IgG, GE healthcare, cat: NA 931), *anti-rabbit* (1:2000) (Amersham ECL Anti-Rabbit IgG, GE healthcare, cat: NA 934). Para a dosagem de STAT3 e fosfo-STAT3 (pSTAT3) no hipotálamo foi utilizada a concentração protéica de 70 μ g, foram usados os anticorpos primários: STAT (1:1000) (STAT3 antibody, peso molecular: 79,86 KDa, Cell Signaling, cat: #9132), pSTAT3 (1:1000) (phospho-STAT3 antibody, peso molecular: 79,86 KDa, Cell Signaling, cat: #9145) e tubulina (entre 1:2000 e 1:4000 para o STAT3 e 1:1500 pSTAT3) (α -tubulina, peso molecular: 50 KDa, Sigma, cat: T6074). Os anticorpos secundários: *anti-mouse* (1:2000) (Amersham ECL Anti-Mouse IgG, GE healthcare, cat: NA 931), *anti-rabbit* (1:2000) (Amersham ECL Anti-Rabbit IgG, GE healthcare, cat: NA 934).

4.4 Considerações éticas

Todos os procedimentos já foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG), projeto número 10-0523.

O projeto está em adequação com as normas e diretrizes vigentes de acordo com a Lei 11.794/08 (BRASIL, 2008) que regula o uso de animais em pesquisas científicas. Os procedimentos propostos por esse projeto obedecem às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO, 1978) e os Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS) para pesquisa com animais (GOLDIM; RAYMUNDO, 1997).

4.5 Análise estatística

Todos os dados coletados foram digitados e analisados no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, EUA). Os dados paramétricos foram expressos como média \pm erro-padrão (E.P). As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, usando como variável independente a exposição crônica as dietas. Ou, por Teste t de *Student* ao comparar dietas específicas ao controle, o objetivo principal deste trabalho foi comparar cada uma das duas dietas com a dieta controle, e não das duas dietas entre si (hipoproteica e hiperlipídica), por isso optou-se pelo uso deste teste. ANOVA de medidas repetidas foi usada para analisar o consumo das diferentes dietas e o ganho de peso durante as cinco semanas, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan, quando indicado (BLISS, 1967; DOWNE; HEATH, 1970). Os dados não-paramétricos foram expressos como mediana (intervalos interquartis) e comparados pelo teste de Mann-Whitney, quando indicado (DOWNE; HEATH, 1970; SIEGEL, 1975). O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Medidas gerais

Em relação ao ganho de peso dos animais ao longo da exposição às dietas (figuras 7 e 8), não houve diferenças significativas entre os grupos e não houve interação. Apenas verificamos que tanto os grupos controle *versus* hiperlídica (C x HF) [F (5, 160) = 126,697, $p < 0,001$] quanto controle *versus* hipoproteica (C x LP) [F (5, 160) = 148,211, $p < 0,001$] apresentaram efeito do tempo ($p < 0,001$). Ou seja, todos os animais ganharam peso ao longo do tratamento.

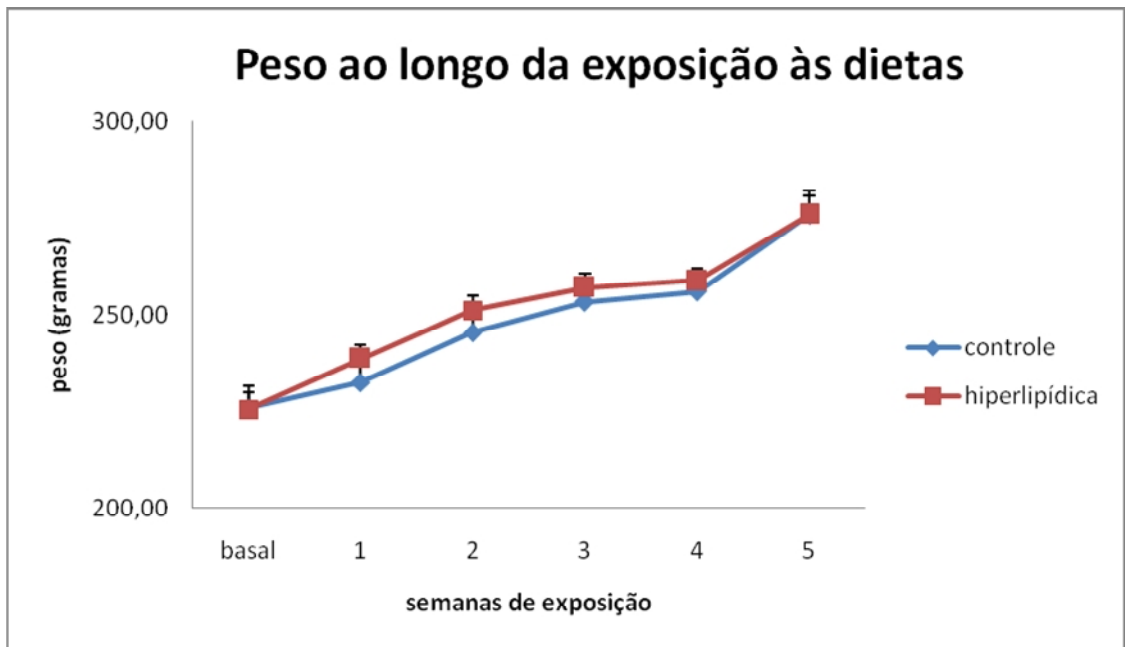


Figura 7: Peso ao longo da exposição às dietas. ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo ($p < 0,001$), sem interação (0,588), sem efeito do grupo ($p = 0,635$). N= 16-18 animais/grupo.

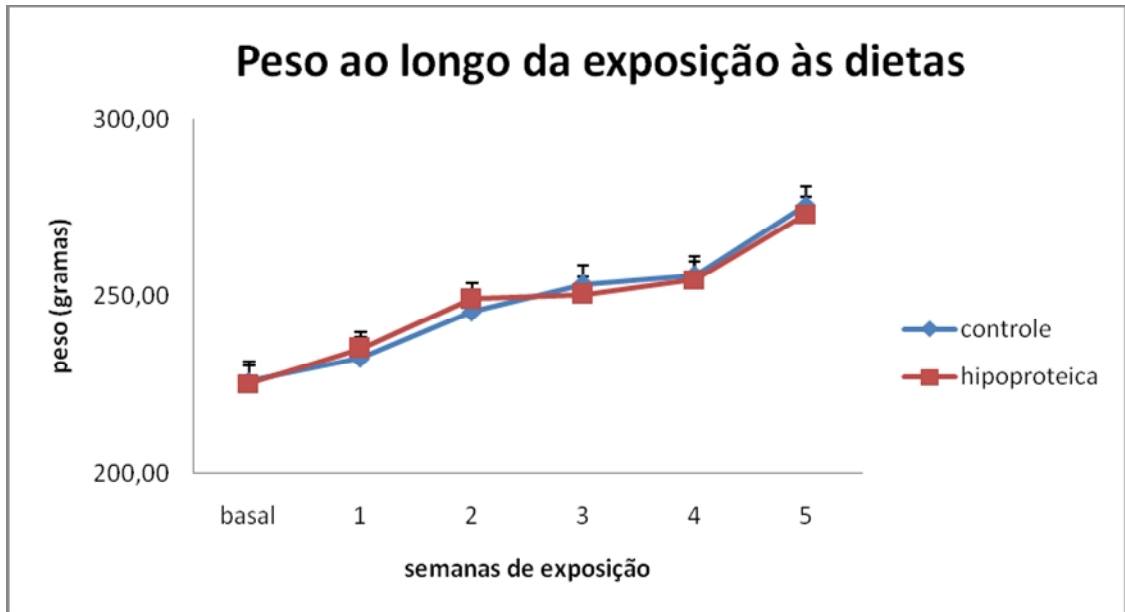


Figura 8: Peso ao longo da exposição às dietas. ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo ($p < 0,001$), sem interação (0,456), sem efeito do grupo ($p=0,975$). N= 16-18 animais/grupo.

Foi realizada uma análise considerando a gordura abdominal sobre o peso corporal com o objetivo de ajustar a proporção de gordura em relação à estrutura corpórea do animal. Foi realizado Teste t de *Student* para os grupos controle *versus* hiperlipídica (C x HF) e controle *versus* hipoproteica (C x LP). Tanto os animais que receberam dieta hiperlipídica (HF) ($p= 0,002$), quanto os que receberam dieta hipoproteica (LP) ($p= 0,023$) apresentaram um maior acúmulo de adiposidade abdominal do que os animais que ingeriram dieta controle (C) (figuras 9 e 10).

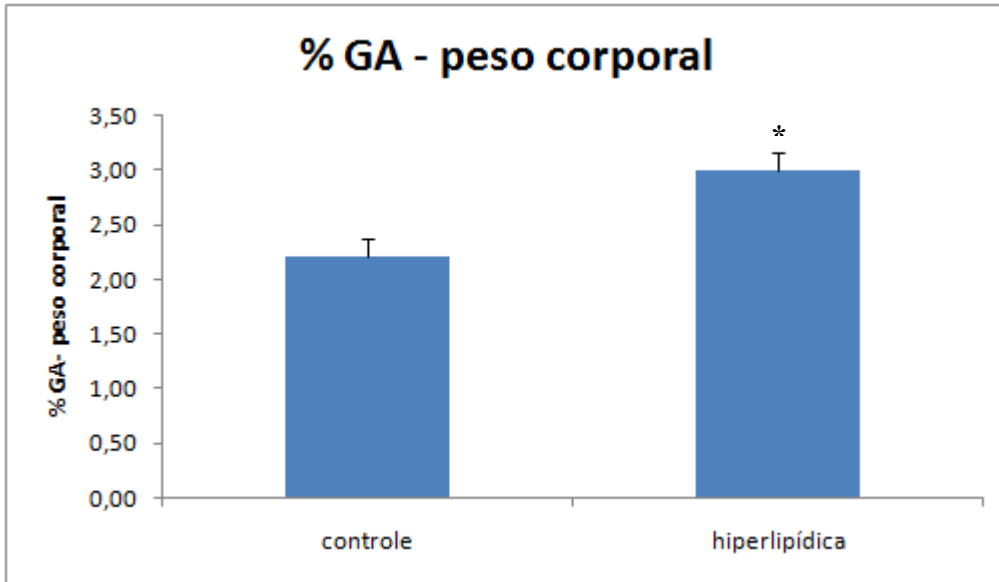


Figura 9: Percentagem da gordura abdominal (GA) em relação ao peso corporal. Teste t de *Student* ($p= 0,002$). N= 23-24 animais/grupo.

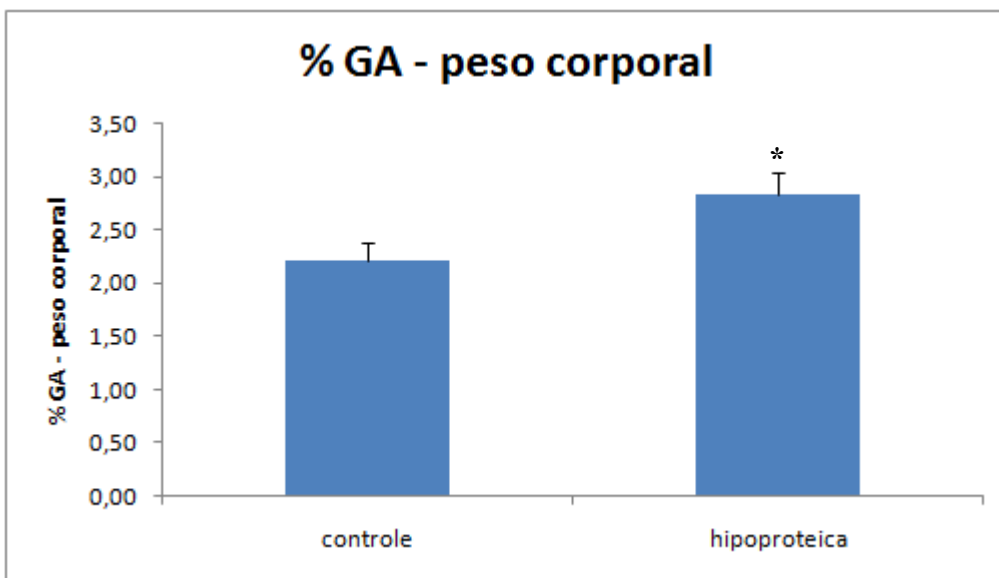


Figura 10: Percentagem da gordura abdominal (GA) em relação ao peso corporal. Teste t de *Student* ($p= 0,023$). N= 23 animais/grupo.

5.2 Experimentos comportamentais

5.2.1 Teste de exposição aguda ao alimento doce - exposição 1 hora ao Froot Loops®

Realizamos um teste de exposição aguda ao alimento doce com o Froot Loops® durante 1 hora. Houve diferença significativa apenas entre controle *versus* hiperlipídica (C x HF), os animais que receberam dieta hiperlipídica (HF) comeram menos pellets de Froot Loops® do que os animais que receberam dieta controle (C) ($p= 0,003$) (figura 11).

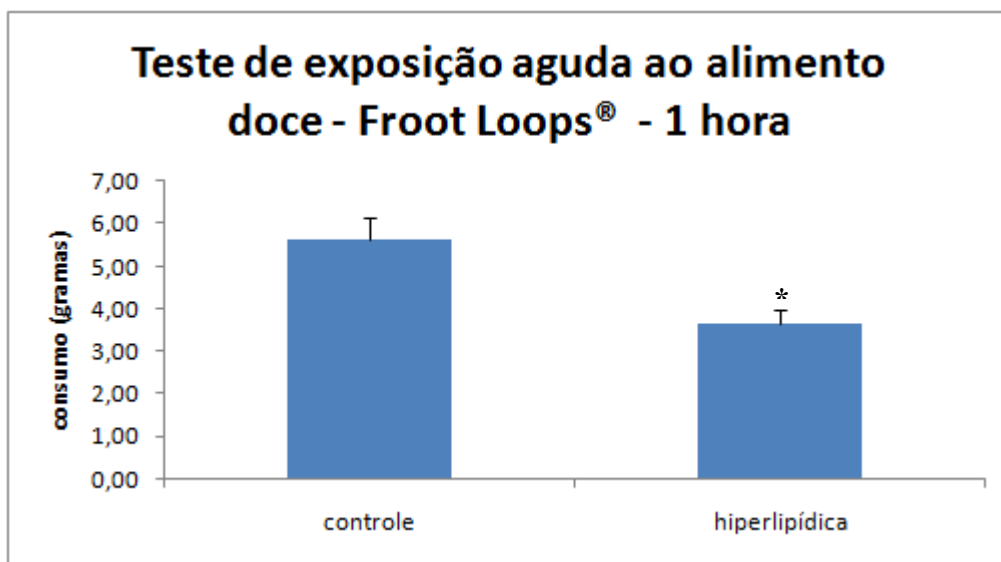


Figura 11: Teste de exposição aguda ao alimento doce com o Froot Loops® durante 1 hora. Teste t de Student ($p= 0,003$). N= 10-12 animais/grupo.

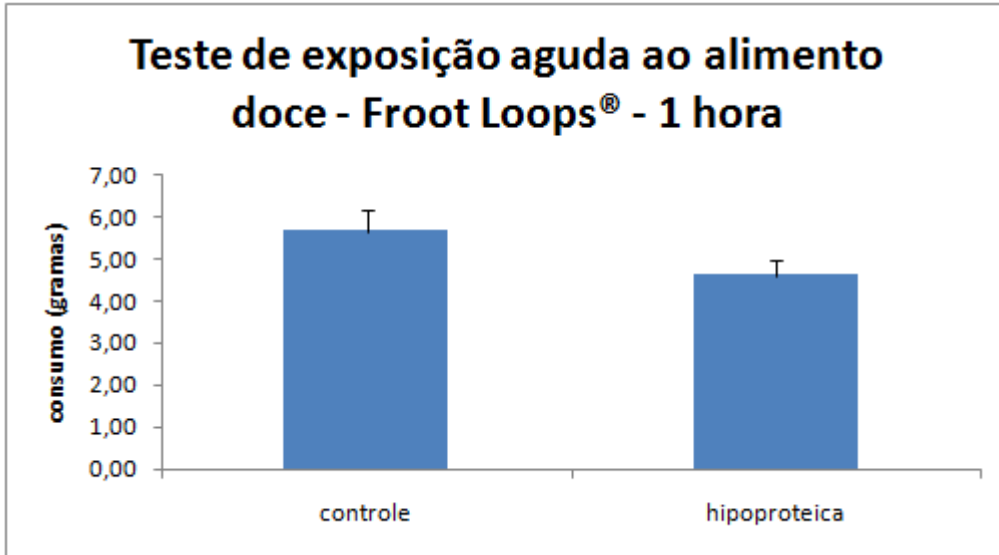


Figura 12: Teste de exposição aguda ao alimento doce com exposição com o Froot Loops® durante 1 hora. Teste t de *Student* ($p= 0,118$). $N= 10$ animais/grupo.

5.2.2 Habituação ao BioDAQ®

Os animais após a 5 semanas de dietas foram expostos durante uma semana ao BioDAQ®. Para a análise dos resultados do dia 1 ao dia 3 foi considerado como período de habituação ao BioDAQ®. Não houve diferença significativa no consumo de dieta entre os grupos (figuras 13 e 14). Controle *versus* hiperlídica (C x HF) [$F(1, 19) = 0,005$, $p= 0,946$] quanto controle *versus* hipoproteica (C x LP) [$F(1, 20) = 0,274$, $p= 0,606$].

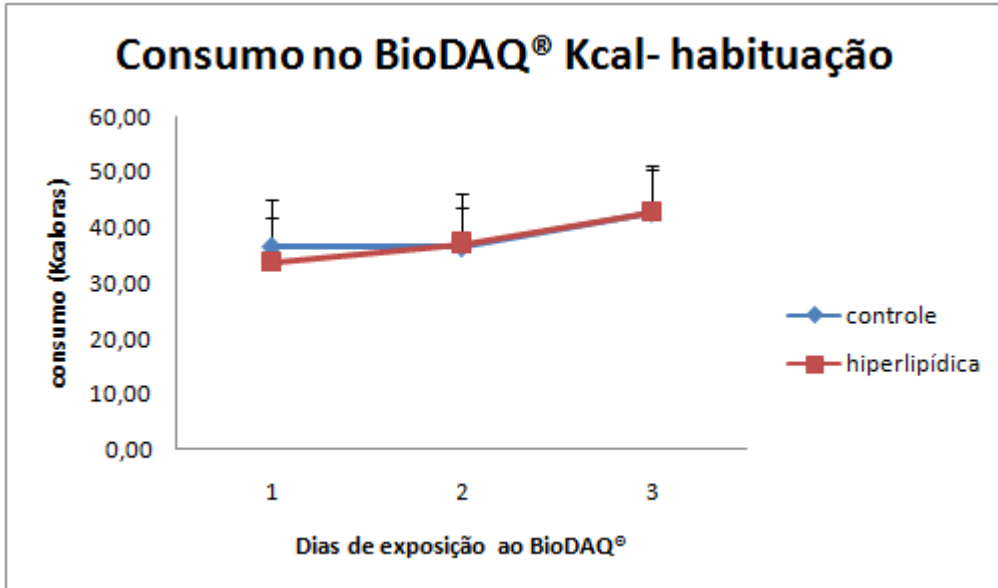


Figura13: Consumo em Kcal durante a a habituação ao BioDAQ®. ANOVA de medidas repetidas, sem efeito do tempo ($p= 0,178$), sem interação ($0,907$), sem efeito do grupo ($p=0,946$). N= 10-11 animais/grupo.

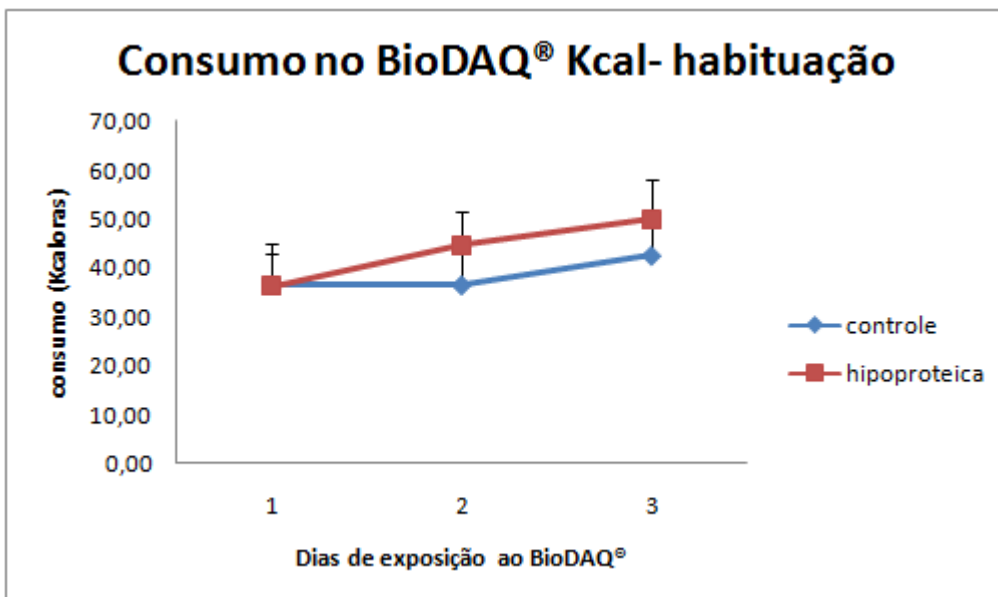


Figura 14: Consumo em Kcal durante a a habituação ao BioDAQ®. ANOVA de medidas repetidas, sem efeito do tempo ($p= 0,054$), sem interação ($0,512$), sem efeito do grupo ($p=0,606$). N= 11 animais/grupo.

5.2.3 Análise do comportamento alimentar durante exposição ao BioDAQ®

A análise do comportamento alimentar no BioDAQ® foi considerada dos dias 4 ao 7, nesse período considerava-se que os animais já estariam habituados ao ambiente novo. Comparando os grupos controle *versus* hiperlipídica (C x HF) (tabela 1). Houve diferença significativa na média do tamanho da refeição (g) ($p= 0,049$) animais que receberam dieta hiperlipídica (HF) tiveram um menor tamanho de refeição do que animais controle (C). Animais HF apresentaram uma menor média no número de porções (g) do que animais C ($p < 0,001$). Tanto a média do tamanho da refeição no ciclo escuro (g) ($p= 0,002$) quanto a média do número de porções ciclo escuro ($p < 0,001$) os animais HF obtiveram médias menores do que os C. Apenas na média do tamanho da porção no ciclo escuro (g) os animais HF obtiveram uma média maior do que os C ($p=0,006$).

Tabela 1 - Caracterização do consumo de ração durante o período de análise do comportamento alimentar no BioDAQ® grupos controle e hiperlipídica

Medidas	Controle	Hiperlipídica	p
Média consumo (Kcal)	53,35 ± 2,35	52,25 ± 3,15	0,781
Média tamanho da refeição (g)	3,06 ± 0,30	2,16 ± 0,28	0,049
Média tamanho da porção (g)	0,58 ± 0,04	0,77 ± 0,08	0,063
Média número de refeições	8,64 ± 0,66	9,97 ± 0,79	0,209
Média número de porções	53,48 ± 3,00	27,63 ± 2,54	< 0,001
PMI total	18259,6 ± 1087,39	16261,32 ± 1118,56	0,236
Saciedade total	316,5 ± 16,95	301,2 ± 21,35	0,605
Média consumo ciclo claro (Kcal)	8,22 ± 1,56	10,39 ± 2,1	0,411
Média tamanho refeição ciclo claro (g)	1,12 ± 0,18	0,93 ± 0,19	0,481
Média tamanho da porção ciclo claro (g)	0,29 ± 0,02	0,38 ± 0,05	0,158
Média número refeições ciclo claro	1,94 ± 0,37	2,63 ± 0,38	0,205
Média número porções ciclo claro	9,18 ± 1,92	6,10 ± 1,11	0,192
PMI ciclo claro	9950,92 ± 1343,27	9570,68 ± 889,83	0,810
Saciedade ciclo claro	1256,42 ± 240,48	1346,04 ± 426,95	0,871
Média consumo ciclo escuro (Kcal)	45,12 ± 3,1	41,86 ± 4,18	0,533
Média tamanho da refeição ciclo escuro (g)	1,96 ± 0,12	1,33 ± 0,12	0,002
Média tamanho da porção ciclo escuro (g)	0,29 ± 0,02	0,44 ± 0,05	0,006
Média número de refeições ciclo escuro	6,7 ± 0,65	7,33 ± 0,69	0,510
Média número de porções ciclo escuro	44,3 ± 3,07	21,53 ± 2,48	< 0,001
PMI ciclo escuro	10161,14 ± 2265,2	9570,25 ± 2811,47	0,872
Saciedade ciclo escuro	288,51 ± 119,69	386,4 ± 223,81	0,704

Teste t de *Student*; n: 6-11 animais/grupo; valores expressos em média ± EP; Houve diferença significativa entre os grupos nas seguintes medidas: média do tamanho da refeição (p= 0,049), média do número de porções (p< 0,001), média tamanho da refeição no ciclo escuro (p= 0,002), média do tamanho porção no ciclo escuro (p= 0,006), média do número de porções no ciclo escuro (p< 0,001).

Durante a análise do comportamento alimentar no BioDAQ® comparando-se os controle *versus* hipoproteica (C x LP) (tabela 2). Foram encontradas diferenças significativas nos seguintes parâmetros: média do tamanho da porção (g) (p= 0,004), média do tamanho da porção no ciclo claro (g) (p= 0,042), média do tamanho da refeição no ciclo escuro (g) (p= 0,035), média do tamanho da porção no ciclo escuro (g) (p= 0,006). Em todos os parâmetros os animais que receberam dieta hipoproteica (LP) tiveram uma média maior do que os animais que receberam dieta controle (C).

Tabela 2 - Caracterização do consumo de ração durante o período de análise do comportamento alimentar no BioDAQ® grupos controle e hipoproteica

Medidas	Controle	Hipoproteica	p
Média consumo (Kcal)	53,35 ± 2,35	61,7 ± 3,51	0,062
Média tamanho da refeição (g)	3,06 ± 0,30	3,92 ± 0,33	0,081
Média tamanho da porção (g)	0,58 ± 0,04	0,79 ± 0,05	0,004
Média número de refeições	8,64 ± 0,66	8,33 ± 0,54	0,726
Média número de porções	53,48 ± 3,00	47,18 ± 2,72	0,135
PMI total	18259,6 ± 1087,39	19656,74 ± 1695,35	0,535
Saciedade total	316,5 ± 16,95	331,53 ± 55,51	0,825
Média consumo ciclo claro (Kcal)	8,22 ± 1,56	10,28 ± 1,23	0,314
Média tamanho refeição ciclo claro (g)	1,12 ± 0,18	1,39 ± 0,1	0,197
Média tamanho da porção ciclo claro (g)	0,29 ± 0,02	0,4 ± 0,04	0,042
Média número refeições ciclo claro	1,94 ± 0,37	2,12 ± 0,32	0,711
Média número porções ciclo claro	9,18 ± 1,92	7,33 ± 1,07	0,410
PMI ciclo claro	9950,92 ± 1343,27	11256,43 ± 1595,96	0,562
Saciedade ciclo claro	1256,42 ± 240,48	1107,96 ± 197,94	0,640
Média consumo ciclo escuro (Kcal)	45,12 ± 3,1	51,42 ± 3,62	0,201
Média tamanho da refeição ciclo escuro (g)	1,96 ± 0,12	2,49 ± 0,2	0,035
Média tamanho da porção ciclo escuro (g)	0,29 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,006
Média número de refeições ciclo escuro	6,7 ± 0,65	6,21 ± 0,44	0,544
Média número de porções ciclo escuro	44,3 ± 3,07	39,85 ± 3,03	0,314
PMI ciclo escuro	10161,14 ± 2265,2	9086,61 ± 868,28	0,651
Saciedade ciclo escuro	288,51 ± 119,69	202,69 ± 43,64	0,493

Teste t de *Student*; n: 6-11 animais/grupo; valores expressos em média ± EP; Houve diferença significativa entre os grupos nas seguintes medidas: média do tamanho da porção (p= 0,004), média do tamanho da porção no ciclo claro (p= 0,042), média do tamanho da refeição no ciclo escuro (p= 0,035), media do tamanho da porção no ciclo escuro (p= 0,006).

5.2.4 Teste de preferência alimentar – Dieta hipersacarídica (HP) no BioDAQ®

No dia 10 foi realizado o teste de preferência alimentar, onde eles poderiam optar entre a ração habitual ou a dieta hipersacarídica (HP), o teste teve duração de 20 horas. Comparando-se os grupos controle *versus* hiperlipídica (C x HF) (tabela 3), os animais que receberam dieta hiperlipídica (HF) apresentaram uma média inferior aos animais que receberam dieta controle (C) nos seguintes parâmetros: consumo de dieta hipersacarídica (Kcal) ($p= 0,034$), número de refeições de dieta hipersacarídica ($p= 0,016$), número de porções de dieta hipersacarídica ($p= 0,001$). Observamos que os animais HF apresentaram médias superiores aos animais C em relação ao tamanho da porção de dieta hipersacarídica (g) ($p= 0,023$), PMI total de dieta hipersacarídica ($p= 0,022$), saciedade total de dieta hipersacarídica ($p= 0,008$). Os animais HF durante o teste da dieta hipersacarídica apresentaram um menor consumo em calorias e um menor número de refeições e porções de dieta hipersacarídica do que os animais C. No entanto, os animais HF apresentam um tamanho de refeição maior do que os animais C, ou seja, comem menos vezes e em maior quantidade. Além do mais, os animais HF apresentam maior intervalo entre refeições e maior saciedade do que os animais C. Durante o teste de preferência alimentar, medidas totais dos grupos, não foi possível mensurar a significância estatística da Saciedade e do PMI (intervalo entre refeições) de ração, pois os animais que receberam dieta controle tiveram um consumo muito pequeno, foi praticamente zero, sendo impossível mensurá-lo. Na análise desse teste dividida por ciclo, optou em analisar apenas os parâmetros relacionados à dieta hipersacarídica.

Tabela 3 - Caracterização do comportamento alimentar durante o teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica (HP) no BioDAQ® medidas totais dos grupos controle e hiperlipídica

Medidas	Controle	Hiperlipídica	p
Consumo de ração (Kcal)	0,85 ± 0,48	4,53 ± 2,11	0,129
Tamanho da refeição de ração (g)	0,36 ± 0,06	0,95 ± 0,23	0,090
Tamanho da porção de ração (g)	0,23 ± 0,04	0,71 ± 0,23	0,141
Número de refeições de ração	0,63 ± 0,32	1,13 ± 0,52	0,425
Número de porções de ração	1,13 ± 0,67	1,75 ± 0,9	0,586
PMI total de ração	não calculável	12143,00 ± 260	não calculável
Saciedade total de ração	não calculável	917,56 ± 93,72	não calculável
Consumo de dieta hipersacarídica (Kcal)	83,7 ± 6,35	63,23 ± 6,01	0,034
Tamanho da refeição de dieta hipersacarídica (g)	1,54 ± 0,16	1,72 ± 0,12	0,381
Tamanho da porção de dieta hipersacarídica (g)	0,42 ± 0,03	0,5 ± 0,02	0,023
Número de refeições de dieta hipersacarídica	11,75 ± 0,82	8,00 ± 1,1	0,016
Número de porções de dieta hipersacarídica	41,75 ± 2,26	26,25 ± 2,67	0,001
PMI total de dieta hipersacarídica	12669,41 ± 871,08	16420,61 ± 1178,83	0,022
Saciedade total de dieta hipersacarídica	157,06 ± 15,11	250,35 ± 26,9	0,008

Teste t de *Student*; n: 7-8 animais /grupo; valores expressos em média ± EP; Houve diferença significativa entre os grupos nas seguintes medidas: consumo de dieta hipersacarídica (Kcal) (p= 0,034), tamanho da porção de dieta hipersacarídica (p= 0,023), número de refeições de dieta hipersacarídica (p= 0,016), número de porções de dieta hipersacarídica (p= 0,001), PMI total de dieta hipersacarídica (p= 0,022), saciedade total de dieta hipersacarídica (p= 0,008).

Durante o teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica (HP), fazendo-se uma comparação entre controle *versus* hipoproteica (C x LP) (tabela 4) podemos observar que os animais que receberam dieta hipoproteica (LP) apresentaram o consumo de dieta hipersacarídica (kcal) (p= 0,030) e o número de porções de dieta hipersacarídica (p= 0,003) menores do que os animais controle (C). Os animais LP mostraram uma maior saciedade do que os controles, saciedade total de dieta hipersacarídica (p= 0,046).

Tabela 4 - Caracterização do comportamento alimentar durante o teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica (HP) no BioDAQ® medidas totais dos grupos controle e hipoproteica

Medidas	Controle	Hipoproteica	p
Consumo de ração (Kcal)	0,85 ± 0,48	15,16 ± 12,53	0,291
Tamanho da refeição de ração (g)	0,36 ± 0,06	1,63 ± 0,52	0,242
Tamanho da porção de ração (g)	0,23 ± 0,04	0,72 ± 0,22	0,259
Número de refeições de ração	0,63 ± 0,32	2,25 ± 1,66	0,365
Número de porções de ração	1,13 ± 0,67	5,13 ± 3,81	0,333
PMI total de ração	não calculável	16628,10 ± 4802,4	não calculável
Saciedade total de ração	não calculável	590,8 ± 473,85	não calculável
Consumo de dieta hipersacarídica (Kcal)	83,7 ± 6,35	64,97 ± 4,46	0,030
Tamanho da refeição de dieta hipersacarídica (g)	1,54 ± 0,16	1,49 ± 0,17	0,854
Tamanho da porção de dieta hipersacarídica (g)	0,42 ± 0,03	0,46 ± 0,03	0,285
Número de refeições de dieta hipersacarídica	11,75 ± 0,82	9,5 ± 0,76	0,063
Número de porções de dieta hipersacarídica	41,75 ± 2,26	29,88 ± 2,37	0,003
PMI total de dieta hipersacarídica	12669,41 ± 871,08	16544,75 ± 1818,27	0,083
Saciedade total de dieta hipersacarídica	157,06 ± 15,11	272,76 ± 47,13	0,046

Teste t de *Student*; n: 8 animais/grupo; valores expressos em média ± EP; Houve diferença significativa entre os grupos nas seguintes medidas: consumo de dieta hipersacarídica (Kcal) (p= 0,030), número de porções de dieta hipersacarídica (p= 0,003), saciedade total de dieta hipersacarídica (p= 0,046).

Fizemos uma análise do teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica (HP), dividindo-se por ciclo claro e escuro, considerando os grupos controle *versus* hiperlipídica (C x HF) (tabela 5). Nós verificamos que durante o ciclo claro, os animais que receberam dieta hiperlipídica (HF) apresentaram um menor número refeições de dieta hipersacarídica (p= 0,020) do que os animais que receberam dieta controle (C) e um maior PMI de dieta hipersacarídica (p= 0,016) em relação aos animais C. No ciclo escuro, os animais HF tiveram um maior tamanho da porção de dieta hipersacarídica (g) (p= 0,015) e um menor número de porções de dieta hipersacarídica (p= 0,007) do que os animais C.

Tabela 5 - Caracterização do comportamento alimentar durante o teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica (HP) no BioDAQ® medidas divididas por ciclo dos grupos controle e hiperlipídica

Medidas	Controle	Hiperlipídica	p
Consumo de dieta hipersacarídica ciclo claro (Kcal)	24,18 ± 2,85	16,64 ± 3,58	0,122
Tamanho refeição de dieta hipersacarídica ciclo claro (g)	1,18 ± 0,15	1,25 ± 0,15	0,745
Tamanho da porção de dieta hipersacarídica ciclo claro (g)	0,43 ± 0,04	0,45 ± 0,03	0,636
Número refeições de dieta hipersacarídica ciclo claro	4,38 ± 0,42	2,75 ± 0,45	0,020
Número porções de dieta hipersacarídica ciclo claro	11,63 ± 0,92	7,75 ± 1,75	0,070
PMI de dieta hipersacarídica ciclo claro	8494,9 ± 770,63	11449,05 ± 722,39	0,016
Saciedade de dieta hipersacarídica ciclo claro	465,25 ± 157,42	765,74 ± 190,27	0,241
Consumo de dieta hipersacarídica ciclo escuro (Kcal)	59,51 ± 4,95	46,59 ± 5,23	0,094
Tamanho da refeição de dieta hipersacarídica ciclo escuro (g)	1,79 ± 0,23	2,02 ± 0,17	0,444
Tamanho da porção de dieta hipersacarídica ciclo escuro (g)	0,42 ± 0,03	0,55 ± 0,04	0,015
Número de refeições de dieta hipersacarídica ciclo escuro	7,38 ± 0,71	5,25 ± 0,98	0,100
Número de porções de dieta hipersacarídica ciclo escuro	30,13 ± 2,64	18,5 ± 2,51	0,007
PMI de dieta hipersacarídica ciclo escuro	4174,52 ± 351,62	5159,4 ± 606,79	0,187
Saciedade de dieta hipersacarídica ciclo escuro	73,87 ± 8,22	131,65 ± 29,12	0,092

Teste t de *Student*; n: 7-8 animais/grupo; valores expressos em média ± EP; Houve diferença significativa entre os grupos nas seguintes medidas: número de refeições de dieta hipersacarídica no ciclo claro (p= 0,020), PMI de dieta hipersacarídica no ciclo claro (p= 0,016), tamanho da porção de dieta hipersacarídica no ciclo escuro (g) (p= 0,015), número de porções de dieta hipersacarídica no ciclo escuro (p= 0,007).

No teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica (HP), dividindo-se por ciclo claro e escuro, considerando os grupos controle *versus* hipoproteica (C x LP) (tabela 6). Nós observamos que os animais que receberam dieta hipoproteica (LP) no ciclo escuro apresentaram um menor consumo de dieta hipersacarídica (Kcal) (p= 0,007) e menor número de porções de dieta hipersacarídica (p= 0,001) do que os animais que receberam dieta controle (C). Os animais LP apresentaram maior saciedade de dieta hipersacarídica ciclo escuro (p= 0,006) do que os animais C. Não houve diferenças significativas no ciclo claro.

Tabela 6 - Caracterização do comportamento alimentar durante o teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica (HP) no BioDAQ® medidas divididas por ciclo dos grupos controle e hipoproteica

Medidas	Controle	Hipoproteica	p
Consumo de dieta hipersacarídica ciclo claro (Kcal)	24,18 ± 2,85	23,16 ± 3,47	0,823
Tamanho refeição de dieta hipersacarídica ciclo claro (g)	1,18 ± 0,15	1,33 ± 0,20	0,542
Tamanho da porção de dieta hipersacarídica ciclo claro (g)	0,43 ± 0,04	0,41 ± 0,02	0,682
Número refeições de dieta hipersacarídica ciclo claro	4,38 ± 0,42	3,75 ± 0,49	0,350
Número porções de dieta hipersacarídica ciclo claro	11,63 ± 0,92	11,63 ± 1,56	1,000
PMI de dieta hipersacarídica ciclo claro	8494,9 ± 770,63	11710,53 ± 1877,61	0,147
Saciedade de dieta hipersacarídica ciclo claro	465,25 ± 157,42	771,52 ± 304,27	0,386
Consumo de dieta hipersacarídica ciclo escuro (Kcal)	59,51 ± 4,95	41,81 ± 2,7	0,007
Tamanho da refeição de dieta hipersacarídica ciclo escuro (g)	1,79 ± 0,23	1,66 ± 0,20	0,658
Tamanho da porção de dieta hipersacarídica ciclo escuro (g)	0,42 ± 0,03	0,49 ± 0,05	0,216
Número de refeições de dieta hipersacarídica ciclo escuro	7,38 ± 0,71	5,75 ± 0,67	0,118
Número de porções de dieta hipersacarídica ciclo escuro	30,13 ± 2,64	18,25 ± 1,19	0,001
PMI de dieta hipersacarídica ciclo escuro	4174,52 ± 351,62	4834,23 ± 352,7	0,207
Saciedade de dieta hipersacarídica ciclo escuro	73,87 ± 8,22	118,75 ± 11,31	0,006

Teste t de *Student*; n: 8 animais/grupo; valores expressos em média ± EP; Houve diferença significativa entre os grupos nas seguintes medidas: consumo de dieta hipersacarídica no ciclo escuro (kcal) (p= 0,007), número de porções de dieta hipersacarídica no ciclo escuro (p= 0,001), saciedade de dieta hipersacarídica no ciclo escuro (p= 0,006).

5.3 Medidas periféricas

Foram realizadas dosagens bioquímicas periféricas, comparando os controles *versus* hiperlídica (C x HF) (tabela 7). O Teste t de *Student* não detectou diferenças significativas entre os animais, BDNF no soro (p= 0,697), glicemia no soro (p= 0,397).

Tabela 7 – Análises bioquímicas: medidas periféricas grupos controle e hiperlipídica

Medidas	Controle	Hiperlipídica	p	n
BDNF no soro (picograma/ml)	5565,00 ± 426,67	5816,66 ± 470,99	0,697	10 animais/grupo
Glicemia (mg/dl)	143,19 ± 13,64	126,72 ± 12,94	0,397	7-8 animais/grupo

BDNF e glicemia mensurados no soro. Teste t de *Student*; valores expressos em média ± EP. Não houve diferença significativa entre os grupos.

O Teste t de *Student* não detectou diferenças significativas entre os animais controle *versus* hipoproteica (C x LP) (tabela 8), glicemia no soro ($p= 0,463$). Podemos observar que encontramos um resultado marginal para BDNF no soro ($p= 0,053$).

Tabela 8 – Análises bioquímicas: medidas periféricas grupos controle e hipoproteica

Medidas	Controle	Hipoproteica	p	n
BDNF no soro (picograma/ml)	5277,78 ± 352,75	4318,27 ± 292,7	0,053	9 animais/grupo
Glicemia no soro (mg/dl)	143,19 ± 13,64	129,30 ± 12,27	0,463	7-9 animais/grupo

BDNF e glicemia mensurados no soro. Teste t de *Student*; valores expressos em média ± EP. Não houve diferença significativa entre os grupos.

5.4 Medidas centrais

Considerando as análises bioquímicas centrais, comparando os grupos controle *versus* hiperlipídica (C x HF) (tabela 9). Através do Teste t de *Student* podemos detectar que os animais que receberam dieta hiperlipídica (HF) apresentaram uma média superior aos animais que receberam dieta controle (C) em relação ao pSTAT-3 no hipotálamo ($p= 0,013$). O teste Mann-Whitney demonstrou que a fosfo-tirosina hidroxilase no núcleo accumbens (pTH) ($p= 0,05$) apresentou uma média inferior nos animais HF os comparando aos animais controles (C).

Tabela 9 – Análises bioquímicas: medidas centrais grupos controle e hiperlipídica

Medidas	Controle	Hiperlipídica	p	n	Teste
STAT3 no hipotálamo	2,07 ± 0,21	2,75 ± 0,36	0,121	6 - 7	Teste t
pSTAT3 no hipotálamo	0,48 ± 0,03	0,77 ± 0,08	0,013	7	Teste t
Tirosina hidroxilase no núcleo accumbens	0,51 ± 0,15	0,43 ± 0,17	0,743	4 - 5	Teste t
Fosfo-tirosina hidroxilase no núcleo accumbens	511,41 ± 127,45	243,68 ± 51,88	0,05	4 - 5	Mann-Whitney
Atividade JAK no hipotálamo	4,35 ± 0,47	3,48 ± 0,49	0,226	6 - 7	Teste t
Atividade dopamina no núcleo accumbens	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,403	4 - 5	Teste t
BDNF VTA (micrograma por microlitro)	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,971	12 - 13	Teste t
BDNF NTS (micrograma por microlitro)	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,957	11 - 13	Teste t

Razão de STAT3 e fosfo-STAT3 (pSTAT3) mensuradas no hipotálamo, razão de tirosina hidroxilase (TH) e fosfo-tirosina hidroxilase (pTH) mensuradas no núcleo accumbens, atividade JAK mensurada no hipotálamo, atividade da dopamina mensurada no núcleo accumbens, BDNF mensurado na área tegmentar ventral (VTA) e núcleo do trato solitário (NTS). Teste Mann-Whitney para fosfo-tirosina hidroxilase e Teste t de *Student* para demais medidas; valores expressos em média ± EP. Houve diferença significativa entre os grupos nas seguintes medidas: pSTAT3 no hipotálamo (p= 0,013), fosfo-tirosina hidroxilase no núcleo accumbens (p= 0,05).

Comparando os animais controle *versus* hipoproteica (C x LP) (tabela 10), em relação às medidas bioquímicas centrais. Através do teste Mann-Whitney podemos observar que a média de STAT3 no hipotálamo (p= 0,035) foi inferior nos animais que receberam dieta hipoproteica (LP) aos animais que receberam dieta controle (C). Não houve diferenças significativas entre os grupos nos demais parâmetros analisados.

Tabela 10 – Análises bioquímicas: medidas centrais grupos controle e hipoproteica

Medidas	Controle	Hipoproteica	p	n	Teste
STAT3 no hipotálamo	1,26 ± 0,23	0,72 ± 0,04	0,035	7	Mann-Whitney
pSTAT3 no hipotálamo	0,17 ± 0,05	0,20 ± 0,05	0,658	7	Teste t
Tirosina hidroxilase no núcleo accumbens	0,51 ± 0,15	0,61 ± 0,13	0,626	4 - 5	Teste t
Fosfo-tirosina hidroxilase no núcleo accumbens	511,41 ± 127,45	454,91 ± 103,16	0,737	4 - 5	Teste t
Atividade JAK no hipotálamo	17,38 ± 6,43	5,90 ± 2,04	0,131	7	Teste t
Atividade dopamina no núcleo accumbens	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,345	4 - 5	Teste t
BDNF VTA (micrograma por microlitro)	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,859	12 - 13	Teste t
BDNF NTS (micrograma por microlitro)	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,822	13	Teste t

Razão de STAT3 e fosfo-STAT3 (pSTAT3) mensuradas no hipotálamo, razão de tirosina hidroxilase (TH) e fosfo-tirosina hidroxilase (pTH) mensuradas no núcleo accumbens, atividade JAK mensurada no hipotálamo, atividade da dopamina mensurada no núcleo accumbens, BDNF mensurado na área tegmentar ventral (VTA) e núcleo do trato solitário (NTS). Teste Mann-Whitney para fosfo-tirosina hidroxilase e Teste t de *Student* para demais medidas; valores expressos em média ± EP. Houve diferença significativa entre os grupos apenas em STAT3 no hipotálamo (p= 0,035).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo nós analisamos separadamente os grupos controle *versus* dieta hiperlídica (C x HF) e controle *versus* dieta hipoproteica (C x LP). Observamos que todos os animais ganharam peso ao longo da exposição às dietas. Isso pode ser explicado pelo fato de as dietas terem o valor calórico semelhante (a dieta hiperlídica apresenta o valor calórico discretamente superior às outras), tendo como diferença entre elas principalmente a sua composição nutricional. As dietas controle e hipoproteica apresentam 3,64 Kcal/g e a dieta hiperlipídica 4,59 Kcal/g.

Nós analisamos a gordura abdominal sobre o peso corporal com o objetivo de ajustar a proporção de gordura em relação à estrutura corpórea do animal. Tanto os animais que receberam dieta hiperlipídica (HF), quanto os que receberam dieta hipoproteica (LP) apresentaram um maior acúmulo de adiposidade abdominal do que os animais que ingeriram dieta controle (C). Interessantemente, essas diferentes dietas levam ao mesmo desfecho. Em humanos, podemos comparar a indivíduos que ingerem dietas ricas em gorduras, tais como lanches, doces, etc, e pessoas que têm uma alimentação deficitária em proteínas. Esses dois extremos (pobreza x fartura) resultando em um mesmo desfecho (obesidade abdominal) lembram a teoria da similaridade nas desigualdades (SILVEIRA *et al.*, 2005), um fenômeno sócio-biológico no qual pessoas pertencentes a estratos sociais opostos parecem apresentar desfechos de saúde similares (SILVEIRA *et al.*, 2005). Em outros modelos animais também se observa que tanto a exposição crônica a dieta hipoproteica (WHITE *et al.*, 2000; WHITE *et al.*, 1994) quanto à dieta hiperlipídica (AINSLIE *et al.*, 2000; SURWIT *et al.*, 1995) podem levar a aumento de adiposidade abdominal.

A dieta hiperlipídica apresenta um maior conteúdo calórico, essa diferença energética em relação à dieta controle poderia influenciar nos resultados. No entanto, verificou-se que não houve relação entre as calorias de cada refeição (consumo calórico total médio do dia / número de refeições médio total) e o intervalo de tempo entre as refeições (PMI). O maior conteúdo calórico da dieta hiperlipídica não influenciou no número de refeições ou no tamanho da mesma. Esperava-se que os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentassem um maior intervalo entre as refeições e maior saciedade (durante a análise do comportamento alimentar no BioDAQ®). Visto que a dieta hiperlipídica apresenta uma maior quantidade de lipídios, o que poderia conferir maior saciedade. Uma possível explicação seria uma alteração da sinalização de BDNF e/ou leptina no NTS. Esta possibilidade é melhor discutida abaixo. No entanto, apesar de não haver diferenças nos

níveis protéicos de BDNF no NTS nos animais HF, não podemos excluir a possibilidade de uma alteração no funcionamento do receptor TrkB ou na indução da cascata de sinalização intracelular pós-receptor nesses animais.

Um estudo demonstrou que a exposição aguda (9 dias de exposição) à dieta hiperlipídica (20% de lipídios) levou a uma redução do intervalo entre refeições e o aumento do tamanho da mesma, maior ganho de peso e adiposidade comparado aos controles, e tamanho da refeição foi correlacionado com o aumento de adiposidade (MELHORN *et al.*, 2010). No estudo de Melhorn, a exposição à dieta hiperlipídica levou a diminuição da saciedade, aumento do tamanho da refeição e maior ganho de peso, diferentemente deste estudo. Isso talvez possa ser explicado pelo tempo de exposição à dieta, uma vez que Melhorn *et al.* (2010) utilizou uma exposição aguda ou subaguda.

No teste de exposição aguda ao alimento doce, nós oferecemos ao animal durante 1 hora o Froot Loops®. Nós observamos que os animais que receberam dieta hiperlipídica (HF) comeram menos pellets de Froot Loops® do que os animais controle (C). Esses mesmos animais (HF) apresentaram uma diminuição da fosforilação da tirosina hidroxilase no núcleo accumbens em relação aos animais controles. De acordo com a literatura, o consumo crônico de dietas hiperlipídicas diminui a preferência pelo alimento hiperpalatável, havendo uma diminuição do metabolismo dopaminérgico mesolímbico (DAVIS *et al.*, 2008), que vai de encontro com os dados deste estudo. A dieta hiperlipídica pode levar a diminuição nos níveis de dopamina no núcleo accumbens (RADA *et al.*, 2010) e no hipotálamo (LEVIN *et al.*, 1986).

Li *et al.* (2009) expôs camundongos a 14 semanas de dieta hiperlipídica, levando os animais a obesidade e a diminuição da expressão gênica de tirosina hidroxilase no VTA, no hipotálamo ventromedial e substância nigra. Sugere-se que o consumo de dieta rica em gordura possa causar o aumento de liberação de dopamina em áreas mesolímbicas e relacionadas à recompensa, promovendo a hiperfagia (LI *et al.*, 2009). É possível que a diminuição da expressão gênica de tirosina hidroxilase no VTA em ratos que receberam dieta hiperlipídica possa ser um mecanismo de defesa do organismo em resposta à superestimulação crônica da via dopaminérgica mesolímbica. Um estudo mostrou que o consumo crônico de dietas ricas em gordura aumenta a densidade de receptores D2 no núcleo accumbens e partes do putâmen e aumento da expressão de receptor D4 no hipotálamo ventromedial (VMH) e do núcleo lateral septal (HUANG *et al.*, 2005). Sugere-se que o receptor D4 possa estar envolvido no controle inibitório da ingestão alimentar, o aumento da

expressão do receptor (mRNA) D4 pode ser uma resposta defensiva ao ganho de peso (HUANG *et al.*, 2005).

A dopamina pode ser regulada defensivamente no sistema mesolímbico via leptina e insulina (sinais de adiposidade) (LI *et al.*, 2009). Há receptores de leptina e insulina em neurônios dopaminérgicos do VTA (HOMMEL *et al.*, 2006; FIGLEWICZ, 2003). A insulina também suprime a liberação de dopamina no VTA (FIGLEWICZ *et al.*, 2004), a leptina e a insulina podem diminuir a recompensa ao alimento (FIGLEWICZ *et al.*, 2004). O estudo de Li *et al.* (2009) mostrou a relação inversa entre os níveis de leptina e expressão gênica de TH no VTA e substância nigra em animais que receberam dieta hiperlipídica, assim os altos níveis de insulina e leptina desses animais podem inibir a expressão gênica de TH. Em nosso estudo houve a diminuição da pTH no núcleo accumbens. Possivelmente houve uma hiperativação dopaminérgica frente à exposição crônica à dieta hiperlipídica, no entanto, a diminuição do pTH no núcleo accumbens pode ser um mecanismo de defesa do organismo.

A leptina foi descoberta no final de 1994 (ZHANG *et al.*, 1994) abrindo uma nova perspectiva para o estudo do papel dos fatores derivados dos adipócitos no balanço energético homeostático (FRÜHBECK, 2006). É produzida principalmente pelos adipócitos em proporção às reservas de gordura (FRÜHBECK, 2006). Uma das cascatas de sinalização do receptor da leptina é a JAK2/STAT3. A ligação da leptina ao seu receptor promove o recrutamento de outra unidade de receptor que se encontra nas adjacências, formando assim uma estrutura transitoriamente dimérica (ZABEAU *et al.*, 2003). A modificação conformacional induzida pela ligação da leptina e pela dimerização de receptores induz a atividade catalítica da enzima JAK-2 associada, a qual se autofosforila em vários resíduos tirosina, tornando-se assim ativa para que, a seguir, fosforile e ative a outra molécula de JAK-2 ligada ao segundo receptor (TARTAGLIA, 1997). Subseqüentemente, as JAK-2 ativas catalisam a fosforilação dos receptores ObRb nas tirosinas 985 e 1138 (MUNZBERG *et al.*, 2003).

Desta forma, criam-se três sítios ativos que darão continuidade ao sinal da leptina, a ativação do JAK2/STAT3, a ERK / MAP quinase e a 3-fosfoinositol (PI3K) (SAHU, 2003). O sítio do JAK2/STAT3 encontra-se nas adjacências da tirosina 1138 do ObRb fosforilado. Este sítio promove o recrutamento de moléculas da família de transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs, predominantemente STAT-3) responsáveis por conduzir o sinal gerado pela leptina ao núcleo, onde coordenarão a transcrição de genes responsivos ao sinal hormonal (BJORBAEK; KAHN, 2004). Existem 3 classes de reguladores negativos/inibitórios de JAK2/STAT3: SOCS (supressor de sinalização de citocina), PIAS (proteína

inibidora da STAT ativada) e PTPs (proteína tirosina fosfatase) (RAWLINGS *et al.*, 2004). A SOCS faz uma retroalimentação negativa no circuito JAK2/STAT3 (RAWLINGS *et al.*, 2004). A insulina pode atuar no hipotálamo realçando a sinalização da leptina, induzindo a fosforilação STAT3 e sua ativação (CARVALHEIRA *et al.*, 2001).

Estudos mostraram que a leptina atua no comportamento alimentar inibindo a ingestão alimentar (CAMPFIELD *et al.*, 1995; Pelleymounter *et al.*, 1995), a deficiência ou resistência da ação da mesma leva a hiperfagia, diminuição da saciedade e desenvolvimento de obesidade (ISRAEL; CHUA, 2010). A leptina modula o tamanho da refeição (Grill, 2010) através de interações com o BDNF no complexo vagal dorsal (DVC) (SPAETH *et al.*, 2012) e pelo controle hipotalâmico (WOODS *et al.*, 1998). Os níveis séricos de leptina aumentam proporcionalmente com a adiposidade; dietas indutoras de obesidade (dieta hiperlipídica e hipersacarídica) podem levar à hiperleptinemia, levando a uma dessensibilização dos receptores e a conseqüente resistência à leptina (MATHENY *et al.*, 2011). Em indivíduos obesos, há a diminuição da função da leptina levando a diminuição da saciedade, hiperfagia e ganho de peso (AINSLIE *et al.*, 2000; SURWIT *et al.*, 1995). Além do mais, leptina inibe a transmissão dopaminérgica mesoaccumbal, conseqüentemente inibindo o comportamento alimentar (HOMMEL *et al.*, 2006). Nesse estudo nós encontramos que os animais que receberam dieta HF apresentaram níveis hipotalâmicos de pSTAT superiores aos animais controles, o que poderia indicar hiperleptinemia (não foi mensurado leptina nesse trabalho), e o desenvolvimento de uma possível pré-resistência à leptina. Classicamente, a resistência à leptina começa com o aumento dos níveis de leptina, esta hiperleptinemia crônica leva a dessensibilização dos receptores e a resistência do mesmo (MATHENY *et al.*, 2011). De acordo com a literatura animais que apresentaram aumento da adiposidade abdominal mostraram ter níveis aumentados de leptina (MANERÁS *et al.*, 2007; CHAPADOS *et al.*, 2008), concordando com nossos achados.

Não houve o desenvolvimento de obesidade, apenas aumento da adiposidade abdominal. Possivelmente, o organismo ainda esteja conseguindo lidar com a superestimulação dopaminérgica e talvez se a dieta fosse ofertada durante mais semanas os animais desenvolveriam obesidade como encontrado em Li *et al.* 2009, assim como resistência à insulina e leptina. Neste trabalho, não avaliamos os níveis séricos de leptina e insulina, no entanto a avaliação futura destes será fundamental para um melhor entendimento do quadro apresentado neste estudo. Talvez, possamos dizer que os animais desse estudo desenvolveram pré-resistência à insulina e leptina, e por isso observamos apenas algumas alterações, por exemplo, o aumento da adiposidade abdominal e alterações neuroquímicas

(aumento nos níveis de pSTAT) e o não desenvolvimento de obesidade. Alguns conceitos para o melhor entendimento dos resultados merecem ser descritos. Resistência à insulina é definida como mudança na atividade biológica da sensibilidade da insulina a tecidos periféricos, que resulta na eficácia diminuída da insulina em reduzir os níveis glicêmicos séricos (GEISSLER; POWERS, 2005; CIOLAC; GUIMARÃES, 2004). A intolerância à glicose de jejum (IGJ) é uma condição metabólica que na maioria das vezes precede o diabetes, geralmente não causa sintomas, necessitando da dosagem da glicemia de jejum para ser diagnosticada, é considerado intolerância à glicose valores de glicemia entre 140-199 mg/dl (GENUTH, 2003; CIPRIANO *et al.*, 2006). A diabetes mellitus é o distúrbio metabólico envolvendo a piora do metabolismo de glicose devido à falha da secreção do hormônio insulina (diabetes insulino-dependente ou diabetes tipo I) ou a piora da resposta dos tecidos à insulina (diabetes insulino-independente ou tipo II), níveis glicêmicos iguais ou superiores a 200 mg/dl é considerado diabetes (GEISSLER; POWERS, 2005; GENUTH, 2003). Resistência à leptina é a dessensibilização dos receptores de leptina ocasionada pela hiperleptinemia (MATHENY *et al.*, 2011).

Por outro lado, uma possibilidade que poderia explicar a diminuição do consumo de Froot Loops® pelos animais que receberam dieta HF (teste de exposição aguda ao alimento doce), uma vez que esses apresentaram uma maior saciedade e menor consumo de dieta hipersacarídica (relacionado ao menor número de refeições e porções no teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica), seria o excesso de catecolaminas. A tirosina hidroxilase (TH), é uma enzima limitante na biossíntese de catecolaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina). Estas últimas por sua vez são capazes de inibir a tirosina hidroxilase, sendo que esta inibição pode ser revertida pela fosforilação da serina 40 (GORDON *et al.*, 2008; Le BOURDELLES *et al.*, 1991). Concordando com o citado acima observamos uma diminuição da fosfo-tirosina hidroxilase no núcleo accumbens dos animais pertencentes ao grupo HF (conforme comentado anteriormente), o que reflete uma menor atividade desta enzima.

Classicamente a dieta hiperlipídica cronicamente superestimula o sistema dopaminérgico levando a uma *down regulation* do receptor D2 (VOLKOW *et al.*, 2011; PRITCHETT; HAJNAL, 2011), como ocorre na obesidade, há a hipoatividade dopaminérgica. Indivíduos obesos apresentam menos ativação dos sistemas de recompensa promovendo a compulsão alimentar (VOLKOW *et al.*, 2011). Um estudo mostrou que a exposição crônica (20 dias) a dieta hiperlipídica levou a um aumento dos receptores D2, D4 e uma diminuição de DAT (transportador de dopamina) (SOUTH; HUANG, 2008). South e Huang (2008) sugerem que esta diminuição da liberação de dopamina pode ser resultado de

um aumento de hormônios anoréticos como insulina e leptina frente ao consumo crônico de dietas com alto teor de gordura, podendo representar uma resposta defensiva do organismo tentando prevenir o desenvolvimento de obesidade. Em nosso estudo não foram quantificados os receptores de dopamina, no entanto como dieta hiperlipídica leva a hiperativação dopaminérgica e esse estado cronicamente leva a obesidade, podemos sugerir que este trabalho concorda com os achados de South e Huang (2008), pois não houve o desenvolvimento de obesidade, apenas o aumento da adiposidade abdominal. Vale ressaltar que no estudo de South e Huang (2008) o tempo de exposição crônica foi relativamente curto é provável que exposições mais longas a dieta hiperlipídica levem a dessensibilização dos receptores de dopamina.

Não podemos deixar de abordar que os animais que receberam dieta hiperlipídica durante o teste de preferência alimentar – dieta hipersacarídica apresentaram um menor consumo dieta hipersacarídica (HP). Esse resultado concorda com o achado de que os animais HF tiveram um menor consumo de Froot Loops® no teste de exposição aguda ao alimento doce – Froot Loops®. Conforme discutido acima, o menor consumo de alimento palatável nesses animais poderia estar relacionado com o aumento da gordura abdominal apresentado por estes o que levaria a um aumento nos níveis de leptina e na sinalização mediada por este hormônio. Isso poderia modificar a sinalização dopaminérgica mesoaccumbal e conseqüentemente afetar o consumo de alimento palatável. Isso é possível, uma vez que propriamente verificamos uma alteração na fosforilação do TH no núcleo accumbens desses animais. Além disso, investigamos o possível papel do BDNF no VTA na modulação dessa via, conforme sugerido por Cordeira e Rios (2011). Apesar de não termos encontrado diferenças no nível dessa neurotrofina no VTA não podemos descartar diferenças na sinalização intracelular dessa via, conforme comentado anteriormente.

Esse menor consumo de alimento hiperpalatável também poderia estar relacionado com o comportamento do tipo depressivo. Uma das características do modelo animal de depressão (estresse crônico variado) é a diminuição do consumo e preferência por soluções doces, indicando diminuição da responsividade à recompensa (WILNER, 1991; KATZ, 1982, CREMA *et al.*, 2012). Animais com comportamento do tipo depressivo apresentam comportamento desamparado/imobilidade durante o nado forçado (PORSOLT *et al.*, 1978; CREMA *et al.*, 2012) e anedonia, a incapacidade de sentir prazer diante situações agradáveis. Alimentos doces e gordurosos estimulam a liberação de dopamina, induzem sensações subjetivas prazerosas e são recompensadores (GRIGSON, 2002; MARTEL; FANTINO, 1996), o que não acontece na depressão (hedonia). O comportamento do tipo depressivo é

uma alternativa para explicar a diminuição do consumo de dieta hiperlipídica, devemos salientar que esses animais permaneceram durante todo o experimento em caixas isoladas, é de conhecimento que o isolamento social é ansiogênico (WEISS *et al.*, 2004), no entanto esperava-se que com o decorrer das semanas as ratas se habituassem a essa condição; vale lembrar que os animais controle deste estudo também permaneceram isolados.

Os animais que receberam dieta hipoproteica (LP) apresentaram um menor consumo e, menor número de porções de dieta hipersacarídica, assim como maior saciedade no teste HP. Em decorrência da maior deposição de gordura abdominal encontrada nesse grupo, esses animais provavelmente possuem um aumento dos níveis de leptina. A leptina inibe a dopamina no núcleo accumbens levando à redução do consumo conforme proposto acima com a dieta hiperlipídica, no entanto, nós não encontramos diferenças nos níveis de TH nesses animais. A leptina inibe a dopamina quimicamente e eletrofisiologicamente (PERRY *et al.*, 2010; FULTON *et al.*, 2006; KRÜGEL *et al.*, 2003). Possíveis mecanismos são a hiperpolarização causada pela leptina em neurônios do hipotálamo através da ativação de canais de potássio sensíveis a ATP e uma inibição da despolarização induzida pela liberação de dopamina de terminações neuronais mesencefálicas no hipotálamo (KRÜGEL *et al.*, 2003). De acordo com a literatura animais que apresentaram aumento da adiposidade abdominal mostraram ter níveis aumentados de leptina (MANERÅS *et al.*, 2007; CHAPADOS *et al.*, 2008). A síndrome metabólica – também conhecida como síndrome X, síndrome da resistência à insulina, quarteto mortal ou síndrome plurimetabólica – é caracterizada pelo agrupamento de fatores de risco cardiovascular como hipertensão arterial, resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose/diabete do tipo 2, obesidade central e dislipidemia (LDL-colesterol alto, triglicérides alto e HDL-colesterol baixo) (CIOLAC; GUIMARÃES, 2004). O aumento crônico nos níveis de leptina causa um aumento na produção de SOCS3, que induz uma diminuição da fosforilação do STAT3 (SAHU, 2003). Nesse trabalho nós observamos uma diminuição do STAT3 no HT; a diminuição da disponibilidade de STAT3 para fosforilação após ativação do JAK dificulta a sinalização da leptina e poderia ser caracterizada como a fase inicial da resistência à leptina (LISBOA *et al.*, 2012), sem ainda um comprometimento metabólico intenso o suficiente para afetar o pSTAT3.

Os animais que receberam dieta hipoproteica tiveram uma média de BDNF no soro menor que os animais controle, embora essa diferença não tenha atingido significância estatística ($p= 0,053$). De acordo com SPAETH *et al.*(2012) a sinalização de BDNF e do receptor TrkB contribuem para o controle do balanço energético no núcleo do trato solitário.

O BDNF e a leptina interagem com a sinalização de melanocortina reduzindo a ingestão alimentar (SPAETH *et al.*, 2012). A injeção intraventricular de BDNF leva os animais à perda de peso, diminuição do tamanho da refeição, mas não do número de refeições (SPAETH *et al.*, 2012). Em nossos achados os animais LP apresentaram alterações no padrão de alimentação, mostrando tamanho da refeição maior, tamanho da porção maior, durante a análise do comportamento alimentar, o que faria sentido no caso de menores níveis/menor sinalização de BDNF no NTS/resistência à ação da leptina nessa região. A infusão central de BDNF em ratos resulta em supressão do apetite e perda de peso ou atenuação do ganho de peso (PELLEYMOUNTER *et al.*, 1995). Animais heterozigotos nocaute com redução do BDNF disponível apresentam hiperfagia e obesidade (FOX; BYERLY, 2004, LYONS *et al.*, 1999).

Ainda é possível verificar alguns estudos mostrando que níveis de BDNF diminuídos estão relacionados a distúrbios depressivos (AYDEMIR *et al.* 2006; KAREGE *et al.* 2005; LEE *et al.*, 2007; SHIMIZU *et al.*, 2003). Tem sido demonstrado que a exposição a dietas hipoproteicas em ratos pode levar a comportamento do tipo depressivo (LIEBERMAN *et al.*, 2005). Em humanos, a exposição crônica a dieta hipoproteica pode levar a um déficit de aminoácidos e a desregulação na neurotransmissão no sistema nervoso central (YOUNG, 1996), uma dieta pobre em triptofano pode desencadear sintomas depressivos (YOUNG *et al.*, 1985; VAN der DOES, 2001). No teste de preferência alimentar - dieta hipersacarídica, os animais LP apresentam um consumo menor de dieta HP, podendo significar anedonia nesses animais.

Nós analisamos a fosforilação de STAT3 frente à exposição aguda ao alimento doce – Froot Loops® durante uma hora. Visto que os animais ingeriam agudamente o alimento doce após terem ficado 4 h em jejum, o consumo causou distensão gástrica (visível após a decapitação). A distensão gástrica estimula a ação da leptina no rombencéfalo (HUO *et al.*, 2007) estimula a fosforilação do STAT3 no hipotálamo. Caso os animais expostos à dieta hipoproteica fossem resistentes à leptina, a coleta de tecidos logo após esse desafio agudo poderia revelar menor fosforilação de STAT3 no hipotálamo; apesar de não termos encontrado este resultado, vimos que os animais têm menor disponibilidade de STAT3 nessa estrutura conforme discutido acima. Além disso, este estado de “pré-resistência à leptina” poderia interferir na interação leptina vs BDNF no NTS (SPAETH *et al.*, 2012), o que poderia explicar as alterações no tamanho de refeição reportados neste grupo.

Smith (1996) propõe que o tamanho da refeição pode ser controlado por mecanismos diretos e indiretos. O controle direto se dá através do estímulo da comida a receptores do trato

gastrointestinal (começa na boca até o intestino). O controle indireto ocorre através da ritmicidade, metabolismo, cognição, entre outros, o controle indireto altera o tamanho da refeição por modulação da potência do controle direto (SMITH, 1996). De acordo com essa teoria, nesse trabalho foram estudados mais os fatores indiretos, nós estudamos os hormônios modulando o sistema nervoso central, bem como a regulação central do comportamento alimentar. O estradiol poderia ser um controle indireto do tamanho da refeição (ECKEL, 2005), o estradiol induz a perda de peso e redução da ingestão alimentar (GEARY; ASSARIAN, 1999). Nesse estudo não foi avaliado o ciclo estral, portanto a ciclicidade hormonal das ratas pode também estar afetando no comportamento alimentar das mesmas diante as diferentes dietas (hipoproteica e hiperlipídica), devendo o mesmo ser investigado em trabalhos futuros.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados nesse trabalho, os animais de ambos os grupos (dieta hipoproteica e hiperlipídica) apresentaram o aumento da adiposidade abdominal, tamanho da porção maior durante o ciclo escuro (na análise do comportamento alimentar com relação ao consumo de ração) e provável pré-resistência à insulina e leptina (aumento do pSTAT animais HF e diminuição STAT em animais LP). Além disso, ambas as dietas levaram a uma diminuição no consumo de dieta hipersacarídica e a um aumento na saciedade. Dessa forma, diferentes dietas levaram a desfechos semelhantes, concordando com a teoria da similaridade das desigualdades. Ambas mudaram a composição corporal, a estrutura da alimentação e induziram mudanças neuroquímicas. Embora essas dietas apresentem uma composição diferente, as duas levaram a perfis metabólicos similares e a pré-resistência à insulina e leptina (“pré-síndrome metabólica”). A qualidade da dieta (quantidade de macronutrientes) que o indivíduo recebe pode levar à alterações neuroquímicas, bem como no comportamento alimentar do mesmo.

Os animais que receberam dieta hipoproteica tiveram uma média de BDNF no soro menor que os animais controle, embora essa diferença tenha sido marginalmente significativa. Possivelmente, o BDNF juntamente com a leptina pode estar modulando o tamanho da refeição nesses animais. Mais estudos são necessários para se confirmar essa hipótese.

Os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram uma diminuição nos níveis de pTH no núcleo accumbens o que pode estar associado a um mecanismo de defesa do organismo frente a uma hiperativação dopaminérgica.

Como perspectivas para novos estudos seria interessante a avaliação do ciclo estral das ratas, a funcionalidade do sistema dopaminérgico mesolímbico frente a desafios com dieta hiperpalatável através de técnicas como a voltametria, assim como a sinalização intracelular de BDNF no VTA e NTS.

REFERÊNCIAS

Abizaid A, Horvath TL. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regul Pept.* 2008; 149(1-3):3-10.

Ainslie DA, Proietto J, Fam BC, Thorburn AW. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71:438–42.

Aparecida de França S, Dos Santos MP, Garófalo MA, Navegantes LC, Kettehut Ido C, Lopes CF, Kawashita NH. Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. *Nutrition.* 2009; 25 (11-12): 1186-92.

Araya AV, Orellana X, Espinoza J. Evaluation of the effect of caloric restriction on serum BDNF in overweight and obese subjects: preliminary evidences. *Endocrine.* 2008; 33(3):300-4.

Aydemir C, Yalcin ES, Aksaray S, Kisa C, Yildirim SG, Uzbay T, Goka E. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) changes in the serum of depressed women. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry,* 2006; 30: 1256–1260.

Bagdade JD, Bierman EL, and Porte D Jr. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest.* 1967; 46(10):1549-57.

Banks WA, Farrell CL. Impaired transport of leptin across the blood–brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285(1):E10-5.

Bariohay B, Lebrun B, Moyse E, Jean A. Brain-derived neurotrophic factor plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex. *Endocrinology.* 2005; 146(12):5612-20.

Bariohay B, Roux J, Tardivel C, Trouslard J, Jean A, Lebrun B. Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor type B signaling is a downstream effector of the brainstem melanocortin system in food intake control. *Endocrinology.* 2009;150(6):2646-53.

Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG Jr. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 2003; 421(6925):856-9.

Berridge KC. 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol Behav.* 2009; 97(5):537-50.

Bear M, Connors B, Paradiso M. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso.* 2 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2002.

Beckers S, Peeters A, Zegers D, Mertens I, Van Gaal L, Van Hul W. Association of the BDNF Val66Met variation with obesity in women. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2008; 95(1-2):110-2.

Bernardis LL; Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited: Ingestion behavior. *Neuroscience and Biobehavior Reviews.* 1996; 20(2):189-287.

Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am. J. Physiol.* 1991; 260:R321–R327.

Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm. Res.* 2004;59:305–331

Bliss CI. *Statistics in biology: statistical methods for research in the natural sciences.* vol. 1. McGraw-Hill Book Company, New York, 1967.

Boston BA, Blaydon KM, Varnerin J, Cone RD. Independent and additive effects of central POMC and leptin pathways on murine obesity. *Science.* 1997; 278 (5343):1641-4.

Brasil. Lei nº11.794 de 8 de outubro de 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm. Acesso em 18 jan. 2013.

Buckley PF, Pillai A, Howell KR. Brain-derived neurotrophic factor: Findings in schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry.* 2011; 24(2):122-7.

Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R. & Burn, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 2005; 269, 546-549.

Carvalho JB, Siloto RM, Ignacchitti, Brenelli, SL, Carvalho CR, Leite A, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett.* 2001;500(3):119-24.

Chapados N, Collin P, Imbeault P, Corriveau P, Lavoie JM. Exercise training decreases in vitro stimulated lipolysis in a visceral (mesenteric) but not in the retroperitoneal fat depot of high-fat-fed rats. *Br J Nutr.* 2008; 100(3):518-25.

Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ et al. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science.* 2006; 314(5796):140-3.

Ciolac EGC, Guimarães GV. Exercício físico e síndrome metabólica. *Rev Bras Med Esporte.* 2004; 10 (4): 319-324.

Cipriano D de O; Lima HV; Souza AA dos S; da Silva MCFC; dos Santos ACO. Frequency of individuals with impaired fasting glucose in a university hospital: comparison of diagnostic criteria. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42 (6): 419-423.

Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2001; 25:S63– S67.

Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein and mRNA in the Normal Adult Rat CNS: Evidence for Anterograde Axonal Transport. *J Neurosci.* 1997; 17(7):2295-31.

Cooper SJ. Effects of opiate agonists and antagonists on fluid intake and saccharin choice in the rat. *Neuropharmacology.* 1983; 22(3):323-8.

Cordeira JW, Frank L, Sena-Esteves M, Pothos EN, Rios M. Brain-derived neurotrophic factor regulates hedonic feeding by acting on the mesolimbic dopamine system. *J Neurosci.* 2010; 30(7): 2533-4.

Cordeira J, Rios M. Weighing in the role of BDNF in the central control of eating behavior. *Mol Neurobiol.* 2011; 44(3):441-448.

Crema LM, Petenuzzo LF, Schlabitz M, Diehl L, Mestriner R, Laureano D, Salbego C, Dalmaz C, Vendite C. The effect of unpredictable chronic mild stress on depressive-like behavior and on hippocampal A(1) and striatal A(2A) adenosine receptors. *Physiol Behav.* 2013;109:1-7.

da Silva Benetti C, Silveira PP, Portella AK, Diehl LA, Nunes E, de Oliveira VS, Dalmaz C, Goldani MZ. Could preference for palatable foods, in neonatally handled rats, alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr Res*. 2007; 62 (4):405-11.

da Silva Benetti C. ; Silveira P P, Matte C, Stefanello F, Leite MC, Gonçalves CA, Wyse AT, Dalmaz C, Goldani MZ. Effects of a chronic exposure to a highly palatable diet and its withdrawal, in adulthood, on cerebral Na⁺,K⁺-ATPase and plasma S100B in neonatally handled rats.. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2010; 28(2):153-9.

Dalle Molle R, Portella AK, Goldani MZ, Kapczinski FP, Leistner-Segala S, Salum GA, Manfro GG, Silveira PP. Associations between parenting behavior and anxiety in a rodent model and a clinical sample: relationship to peripheral BDNF levels. *Transl Psychiatry*. 2012; 2, e 195.

Davis C, Strachan S, Berkson M. Sensitivity to reward: Implications for overeating and overweight. *Appetite*. 2004; 42(2):131-8.

Davis JF, Tracy AL, Schurdak JD, Tschöp MH, Lipton JW, Clegg DJ, Benoit SC. Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat. *Behav Neurosci*. 2008; 122(6):1257-63.

Davis C. Psychobiological traits in the risk profile for overeating and weight gain. *International Journal of Obesity*. 2009; 33, S49–S53.

Downe NM, Heath RW. *Basic statistical methods*. Harper & Row., New York, 1970.

Dulloo AG; Jacquet J. Low-protein overfeeding: a tool to unmask susceptibility to obesity in humans. *International Journal of Obesity*. 1999; 23(11):1118-21.

Eckel AL. Estradiol: a rhythmic, inhibitory, indirect control of meal size. *Physiology & Behavior*. 2005; 82: 35– 41.

Elias CF, Lee CE, Kelly JF, Ahima RS, Kuhar M, Saper CB, Elmquist JK. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J. Comp. Neurol*. 2001; 432(1):1-19.

Elfving B, Plougmann PH, Müller HK, Mathé AA, Rosenberg R, Wegener G. Inverse correlation of brain and blood BDNF levels in a genetic rat model of depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2009; 13(5):563-72.

El-Gharbawy AH, Adler-Wailes DC, Mirch MC, Theim KR, Ranzenhofer L, Tanofsky-Kraff M, Yanovski JA. Serum brain derived neurotrophic factor concentrations in lean and overweight children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(9):3548-52.

Elmqvist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS & Saper CB. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 1998; 95(2):741-6.

Figlewicz DP. Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R882–R892.

Figlewicz DP, Bennett J, Evans SB, Kaiyala K, Sipols AJ, Benoit SC. Intraventricular insulin and leptin reverse place preference conditioned with high-fat diet in rats. *Behav Neurosci.* 2004;118(3):479-87.

Fox EA, Byerly MS. A mechanism underlying mature-onset obesity: Evidence from the hyperphagic phenotype of brain-derived neurotrophic factor mutants. *American Journal of Physiology—Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2004; 286(6):R994-1004.

Freeman AY, Soghomonian JJ, Pierce RC. Tyrosine kinase B and C receptors in the neostriatum and nucleus accumbens are co-localized in enkephalin-positive and enkephalin-negative neuronal profiles and their expression is influenced by cocaine. *Neuroscience* 2003; 117(1):147-56.

Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J.* 2006; 393(Pt 1):7-20.

Fulton S, Pissios P, Manchon RP, Stiles L, Frank L, Pothos EN, Maratos-Flier E, Flier JS. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron.* 2006; 51(6):811-22.

Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI, Fu XY. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(13):4661-6.

Gardiner JV, Campbell D, Patterson M, Kent A, Ghatei MA, Bloom SR, Bewick GA. The Hyperphagic Effect of Ghrelin Is Inhibited in Mice by a Diet High in Fat. *Gastroenterology.* 2010; 138(7):2468-76, 2476.e1.

Geary N. Estradiol, CCK and satiation. *Peptides.* 2001; 22 (8): 1251–1263.

Geary N; Asarian L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiology & Behavior*. 1999; 67 (1): 141–147.

Geiger BM, Haburcak M, Avena NM, Moyer MC, Hoebel BG, Pothos EN. Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity. *Neuroscience*. 2009; 159(4):1193-9.

Geisler S, Wise R. Functional implications of glutamatergic projections to the ventral tegmental area. *Rev. Neurosci*. 2008; 19(4-5):227-44.

Geissler, CA, Powers HJ. Human nutrition. 11^a edição. Elsevier, Edinburg, 2005.

Genuth S, Albeti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lenmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw j, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, Zimmet P, Expert commite on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2003; 26(11):3160-7.

Godar R, Dai Y, Bainter H, Billington C, Kotz CM, Wang CF.. Reduction of high fat diet-induced obesity after chronic administration of brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic ventromedial nucleus. *Neuroscience*. 2011; 194:36-52.

Goldim JR, Raymundo MM. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. 2 ed. Porto Alegre: Hospital de Clínicas/ Grupo de Pesquisa e Pós-graduação, 1997. 30p.

Gordon SL, Quinsey NS, Dunkley PR, Dickson PW. Tyrosine hydroxilase activity is regulated by two distinct dopamine-binding sites. *J Neurochem*. 2008;106(4):1614-23.

Grattan DR, Ladyman SR, Augustine RA. Hormonal induction of leptin resistance during pregnancy. *Physiology & Behavior*. 2001; 91(4):366-74.

Grigson PS. Like drugs for chocolate: Separate rewards modulated by common mechanisms. *Physiology & Behavior*. 2002; 76: 389-395.

Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, Halford JC. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*. 2012; 63(1):3-17

Haltia LT, Rinne JO, Merisaari H, Maguire RP, Savontaus E, Helin S, Någren K, Kasinen V. Effects of intravenous glucose on dopaminergic function in the human brain *in vivo*. *Synapse*. 2007; 61(9):748-56.

Hayes MR, Covasa M. Dorsal hindbrain 5-HT₃ receptors participate in control of meal size and mediate CCK-induced satiation. *Brain research*. 2006; 1103(1):99-107.

Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu ZW, Gao XB, Thurmon JJ, Marinelli M, DiLeone, RJ. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*. 2006; 51(6):801-10.

Horvath TL, Diano S, Van den Pol AN. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J. Neurosci*. 1999; 19(3):1072-87

Huang XF, Yu Y, Zavitsanou K, Han M, Storlien L. Differential expression of dopamine D₂ and D₄ receptor and tyrosine hydroxylase mRNA in mice prone, or resistant, to chronic high fat diet-induced obesity. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;135(1-2):150-61.

Huo L, Maeng L, Bjørnbæk C, Grill HJ. Leptin and the Control of Food Intake: Neurons in the nucleus of the solitary tract are activated by both gastric distension and leptin. *Endocrinology*, 2007; 148(5):2189–2197.

Israel D, Chua S Jr. Leptin receptor modulation of adiposity and fertility. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21(1):10-6.

James WPT. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *Journal of Internal Medicine*. 2008; 263(4): 336-52.

Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Andersson M, Svensson L, Engel JA. Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addiction Biology*. 2006; 11(1):45-54.

Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D₂ receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat. Neurosci*. 2010; 13(5):635-41.

Johnson JG, Spitzer RL, Williams JB. Health problems, impairment and illnesses associated with bulimia nervosa and binge eating disorder among primary care and obstetric gynaecology patients. *Psychological Medicine*. 2001; 31(8):1455-66.

Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald N, Schwald M, Aubry J-M, Bertschy G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biological Psychiatry*. 2005; 57: 1068–1072.

Katz RJ. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav* 1982; 16(6):965-8.

Kenny, P. Reward mechanisms on obesity: new insights and future directions. *Neuron*. 2011; 69(4):664-79.

Kennedy GC. The role of fat depot in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc Roy Soc London Biol Sci*. 1952; 140 (901):578-592.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000; 404(6778):635-43.

Kowalski TJ, Farley C, Cohen-Williams ME, Varty G, Spar BD. Melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonism decreases feeding by reducing meal size. *European Journal of Pharmacology*. 2004; 497(1):41-7.

Kurien BT, Hal Scofield R. Western Blotting, *Methods*. 2006; 38(4): 283-293.

Klump KL, Suisman JL, Culbert KM, Kashy DA, Keel PK, Sisk CL. The effects of ovariectomy on binge eating proneness in adult female rats. *Hormones and Behavior*. 2011; 59(4):585-93.

Krügel U, Schraft T, Kittner H, Kiess W, Illes P. Basal and feeding-evoked dopamine release in the rat nucleus accumbens is depressed by leptin. *Eur J Pharmacol*. 2003; 482(1-3):185-7.

Lam DD, Leininger GM, Louis GW, Garfield AS, Marston OJ, Leshan RL, Scheller EL, Christensen L, Donato J Jr, Xia J, Evans ML, Elias C, Dalley JW, Burdakov DI, Myers MG Jr, Heisler LK. Leptin does not directly affect CNS serotonin neurons to influence appetite. *Cell Metab*. 2011; 13(5):584-91.

Le Bourdelles B., Horellou P., Le Caer J. P., Deneffe P., Latta M., Haavik J., Guibert B., Mayaux J. F. and Mallet J. Phosphorylation of human recombinant tyrosine hydroxylase isoforms 1 and 2: an additional phosphorylated residue in isoform 2, generated through alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 1991; 266, 17124–17130.

Lee BH, Kim H, Park SH, Kim YK. Decreased plasma BDNF level in depressive patients. *Journal of Affective Disorders*. 2007; 101: 239–244.

Levin BE, Triscari J, Sullivan AC. The effect of diet and chronic obesity on brain catecholamine turnover in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1986;24(2):299-304.

Levin BE. Metabolic sensors: viewing glucose neurones from a broader perspective. *Physiol. Behav*. 2002; 76(3):397-401.

Lent R. Cem bilhões de neurônios?: conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

Li Y, South T, Han M, Chen J, Wang R, Huang XF. High-fat diet decreases tyrosine hydroxylase mRNA expression irrespective of obesity susceptibility in mice. *Brain Res*. 2009;1268:181-9.

Liao GY, An JJ, Gharami K, Waterhouse EG, Vanevski F, Jones KR, Xu B. Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin. *Nature Medicine*. 2012; 18(4):564-71.

Lieberman HR, Yeghiayan SK, Maher TJ. A low-protein diet alters rat behavior and neurotransmission in normothermic and hyperthermic environments. *Brain Res Bull*. 2005; 66 (2):149-54.

Lisboa PC, Oliveira E, Fagundes AT, Santos-Silva AP, Passos MC, Moura EG. Postnatal low protein diet programs leptin signaling in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and pituitary TSH response to leptin in adult male rats. *Horm Metab Res*. 2012; 44(2):114-22.

Lomba A, Martínez JA, García-Díaz DF, Paternain L, Marti A, Campión J, Milagro FI. Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: A nutriepigenetic study on FASN and NDUFB6 gene promoters. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2010; 101(2-3):273-8.

Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L. Brain-derived neurotrophic factor deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 21;96(26):15239-44.

Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W, Torres IL. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides*. 2012; 38 (1):189-96.

Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, Stener-Victori E. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 2007;148(8):3781-91.

Martel P, Fantino M. Mesolimbic dopaminergic system activity as a function of food reward: A microdialysis study. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 1996; 53: 221-226.

Matheny M, Shapiro A, Tumer N, Scarpace PJ. Region-specific diet-induced and leptin-induced cellular leptin resistance includes the ventral tegmental area in rats. *Neuropharmacology*. 2011; 60(2-3):480-7.

Melhorn SJ, Krause EG, Scott KA, Mooney MR, Johnson JD, Woods SC, Sakai RR. Acute exposure to a high-fat diet alters meal patterns and body composition. *Physiology & Behavior*. 2010; 99: 33–39.

Monteleone P, Zanardi R, Tortorella A, Gennarelli M, Castaldo E, Canestrella B, Maj M. The 196G/A (val66met) polymorphism of BDNF gene is significantly associated with binge eating behavior in women with bulimia nervosa or binge eating disorder. *Neurosci Lett*. 2006; 406(1-2):133-7.

Munzberg H, Huo L, Nillni EA, Hollenberg AN, Bjorbaek C. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology*. 2003; 144:2121–2131.

Myers MG Jr, Münzberg H, Leininger GM, Leshan RL. The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC. *Cell Metab*. 2009; 9(2):117-23.

Nookaew I, Svensson PA, Jacobson P, Jernås M, Taube M, Larsson I, Andersson-Assarsson JC, Sjöström L, Froguel P, Walley A, Nielsen J, Carlsson LM. Adipose tissue resting energy expenditure and expression of genes involved in mitochondrial function are higher in women than in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(2):0000–0000.

Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*. 1997; 278(5335):135-8.

Ooi CL, Kennedy JL, Levitan RD. A putative model of overeating and obesity based on brain-derived neurotrophic factor: direct and indirect effects. *Behav Neurosci*. 2012; 126(4):505-14.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6^a edição, Elsevier, 2007.

Pedersen BK, Pedersen M, Krabbe KS, et al. Role of exercise induce brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. *Exp Physiol*. 2009; 94(12):1153-60.

Pelleymounter MA., Cullen M J, Wellman CL. Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Experimental Neurology*. 1995; 131(2):229-38.

Pereira-Lancha LO, Coelho DF, Campos-Ferraz PL, Lancha Jr AH. Body Fat Regulation: Is It a Result of a Simple Energy Balance or a High Fat Intake? *Journal of the American College of Nutrition*. 2010; 29(4): 343–351.

Perry ML, Leininger GM, Chen R, Luderman KD, Yang H, Gnegy ME, Myers MG Jr, Kennedy RT. Leptin promotes dopamine transporter and tyrosine hydroxylase activity in the nucleus accumbens of Sprague-Dawley rats. *J Neurochem*. 2010; 114(3):666-74.

Polonsky KS, Given E, and Carter V. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J ClinInvest*. 1988; 81(2):442-8.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. “Behavioural despair” in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol*. 1978; 51(3):291-4.

Pritchett CE, Hajnal A. Obesogenic diets may differentially alter dopamine control of sucrose and fructose intake in rats. *Physiology & Behavior*. 2011; 104: 111–116.

Pu S, Jain MR, Horvath TL, Diano S, Kalra PS, Kalra SP. Interactions between neuropeptide Y and gamma-aminobutyric acid in stimulation of feeding: a morphological and pharmacological analysis. *Endocrinology*. 1999; 140(2):933-40.

Rada P, Bocarsly ME, Barson JR, Hoebel BG, Leibowitz SF. Reduced accumbens dopamine in Sprague-Dawley rats prone to overeating a fat-rich diet. *Physiol. Behav*. 2010; 101(3): 394-400.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. 2004; *Journal of Cell Science* 117 (8): 1281-1283.

Ribasés M, Gratacòs M, Fernández-Aranda F, Bellodi L, Boni C, Anderlüh M, Cavallini MC, Cellini E, Di Bella D, Erzegovesi S, Foulon C, Gabrovsek M, Gorwood P, Hebebrand J, Hinney A, Holliday J, Hu X, Karwautz A, Kipman A, Komel R, Nacmias B, Remschmidt H, Ricca V, Sorbi S, Wagner G, Treasure J, Collier DA, Estivill X. (2004). Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. *Human Molecular Genetics*. 2004; 13(12):1205-12

Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol* 2001; 15(10):1748-57.

Rolls BJ, Van Duijvenvoorde PM, Rowe EA. Variety in the diet enhances intake in a meal and contributes to the development of obesity in the rat. *Physiol Behav*. 1983; 31(1):21-7.

Roth CL, Elfers C, Gebhardt U, Müller HL, Reinehr T.. Brain-derived neurotrophic factor and its relation to leptin in obese children before and after weight loss. *Metabolism*. 2013; 62: 226-234.

Rothmund Y, Preuschhof C, Bohner G, Bauknecht HC, Klingebiel R, Flor H, Klapp BF. Differential activation of the dorsal striatum by high-calorie visual food stimuli in obese individuals. *Neuroimage*. 2007; 15;37(2):410-21.

Rump P, Otto SJ, Hornstra G. Leptin and phospholipid-esterified docosahexaenoic acid concentrations in plasma of women: observations during pregnancy and lactation. *Eur J Clin Nutr*. 2001; 55(4):244-51.

Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front. Neuroendocrinol* 2003; 24(4):225-53.

Satoh N, Ogawa Y, katsuura G, Tsuji T, Masuzaki H, Hiraoka J, Okazaki T, Tamaki M, Hayase M, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Nakao K. Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats. *Endocrinology*. 1997; 138(3): 947-54.

Sears C, Markie D, Olds R, Fitches A. Evidence of associations between bipolar disorder and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Bipolar Disorders*. 2011; 13(7-8):630-7.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control and food intake. *Nature*. 2000; 404(6778):661-71.

Siegel S. *Estatística não-paramétrica*. São Paulo: Editora McGraw Hill do Brasil, 1975. 350p.

Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ. Obesity in Latin America: similarity in the inequalities. *Lancet*. 2005; 366(9484):451-2.

Skledar M, Nikolac M, Dodig-Curkovic K, Curkovic M, Borovecki F, Pivac N. Association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met and obesity in children and adolescents. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2012; 36(1):136-40.

Smith GP. The direct and indirect controls of meal size. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1996; 20 (1): 41–46.

Sousa M, Brás-Silva C, Leite-Moreira A. O papel da leptina na regulação da homeostasia energética. *Acta Med Port*. 2009; 22: 291-298.

South S, Huang XF. High-fat diet exposure increases dopamine D2 receptor and decreases dopamine transporter receptor binding density in the nucleus accumbens and caudate putamen of mice. *Neurochem Res*. 2008; 33:598–605.

Spaeth AM, Kanoski SE, Hayes MR, Grill HJ. TrkB receptor signaling in the nucleus tractus solitarius mediates the food intake-suppressive effects of hindbrain BDNF and leptin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012; 302(10):E1252-60.

Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological Psychiatry*. 2003; 54: 70–75.

Srinivasan S, Dunn J. Stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α in buffer containing cobalt chloride for Western blot analysis. *Analytical Biochemistry*. 2011; 416(1):120-2.

Stice E, Spoor S, Bohon C, Veldhuizen MG, Small DM. Relation of reward from food intake and anticipated food intake to obesity: a functional magnetic resonance imaging study. *J. Abnorm. Psychol*. 2008a; 117(4):924-35.

Stice E, Spoor S, Bohon C, Small DM.. Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele. *Science*. 2008b; 322(5900):449-52.

Suwa M, Kishimoto H, Nofuji Y, Nakano H, Sasaki H, Radak Z, Kumagai S. Serum brain-derived neurotrophic factor level is increased and associated with obesity in newly diagnosed female patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2006; 55(7):852-7.

Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, Kuhn CM, Rebuffé-Scrive M. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*. 1995; 44(5): 645-651.

Tartaglia LA. The leptin receptor. 1997; 272(10):6093-6.

Tracy AL, Jarrard LE, Davidson TL. The hippocampus and motivation revisited: Appetite and activity. *Behavioural Brain Research*. 2001; 127(1-2):13-23.

Unger TJ, Calderon GA, Bradley LC, Sena-Esteves M, Rios M. Selective deletion do BDNF in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. 2007; 27(52):14265-74

UNESCO. Declaração Universal dos Direitos dos Animais. Proclamada em sessão realizada em Bruxelas em 27 de janeiro de 1978. Disponível em http://www.forumnacional.com.br/declaracao_universal_dos_direitos_dos_animais.pdf. Acesso em: 18 jan. 2013.

Van der Does AJ. The effects of tryptophan depletion on mood and psychiatric symptoms. *J Affect Disord*. 2001; 64 (2-3):107-19.

Valassi E, Scacchi M, Cavagnin F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 2008; 18(2): 158-168.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, Gifford A, Hitzemann R, Ding YS, Pappas N. (1999). Prediction of reinforcing responses to psychostimulants in humans by brain dopamine D2 receptor levels. *American Journal of Psychiatry*. 1999; 156(9):1440-3.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Telang F. Overlapping neuronal circuits in addiction and obesity: evidence of systems pathology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 2008a; 363(1507):3191-200.

Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Thanos PK, Logan J, Alexoff D, Ding YS, Wong C, Ma Y, Pradhan K. Low dopamine striatal D2 receptors are associated with prefrontal metabolism in obese subjects: possible contributing factors. *Neuroimage*. 2008b; 42(4):1537-4.

Volkow ND, Wang G-J, Baler RD. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci*. 2011; 15(1): 37–46.

Wabitsch M, Ballauff A, Holl R, Blum WF, Heinze E, Remschmidt H, et al. Serum leptin, gonadotropin, and testosterone concentrations in male patients with anorexia nervosa during weight gain. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(7):2982-9.

Wade GN. Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. *Physiol Behav*. 1972; 8(3):523-34.

Walsh TB. The importance of eating behavior in eating disorders. *Physiology & Behavior*. 2011; 104 (4):525-9.

Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N, Fowler JS. Brain dopamine and obesity. *Lancet*. 2001; 357(9253):354-7.

Weiss IC, Pryce CR, Jongen-Rêlo AL, Nanz-Bahr NI, Feldon J. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav Brain Res*. 2004; 152(2):279-95.

White BD, He B, Dean RG, Martin RJ. Low protein diets increase neuropeptide Y gene expression in the basomedial hypothalamus of rats. *J Nutr*. 1994; 124 (8): 1152-60.

White BD, Porter MH, Martin RJ. Protein selection, food intake, and body composition in response to the amount of dietary protein. *Physiology & Behavior*. 2000; 69 (4-5): 383–389.

Williams G, Harrold JA, Cutler DJ. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2000; 59(3):385-96.

Willner P. Animal models as simulations of depression. *TIPS* 1991; 12:131-6.

Woods SC, Seeley RJ, Porte D Jr, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*. 1998; 280(5368):1378-83.

Woods SC. Gastrointestinal satiety signals. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am J Physiol Gastrintest Liver Physiol*. 2004; 286(1):G7-13.

Young SN, Smith SE, Pihl RO, Ervin FR. Tryptophan depletion causes a rapid lowering of mood in normal males. *Psychopharmacology*. 1985; 87(2):173-7.

Young SN. Behavioral effects of dietary neurotransmitter precursors: basic and clinical aspects. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996; 20(2):313-23.

Young AA. Brainstem sensing of meal-related signals in energy homeostasis. *Neuropharmacology*. 2012; 63(1):31-45.

Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J, Tavernier J. The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Lett*. 2003; 546(1):45-50.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.