

**Universidade Federal de Ouro Preto**

**Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB)**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (CBIOL)**

---

*Dissertação*

---

**Influência da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica e do estado hormonal associada a suplementação de inulina sobre as alterações metabólicas e comportamentais de ratas Wistar**

***Lucas Gabriel Vieira***

Ouro Preto  
202



LUCAS GABRIEL VIEIRA

**INFLUÊNCIA DA OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA HIPERLIPÍDICA E DO ESTADO HORMONAL ASSOCIADA A SUPLEMENTAÇÃO DE INULINA SOBRE AS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E COMPORTAMENTAIS EM RATAS WISTAR**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

**Co-orientadores:** Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior e Dr<sup>a</sup> Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de Noronha

OURO PRETO

2020

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

V657i Vieira, Lucas Gabriel .

Influência da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica e do estado hormonal associada a suplementação de inulina sobre as alterações metabólicas e comportamentais em ratas Wistar . [manuscrito] / Lucas Gabriel Vieira. - 2020.

82 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvin Menezes.  
Coorientadores: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr., Dra. Sylvana Izaura Salyba Rendeiro Noronha.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Obesidade. 2. Lipídios . 3. Inulina. I. Chianca Jr., Deoclécio Alves. II. Menezes, Rodrigo Cunha Alvin. III. Noronha, Sylvana Izaura Salyba Rendeiro. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 577.12



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Lucas Gabriel Vieira**

INFLUÊNCIA DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA NO METABOLISMO, COMPORTAMENTO E ESTADO HORMONAL DE RATAS WISTAR SUPLEMENTADAS COM INULINA

Membros da banca

Rodrigo Cunha Alvim de Menezes - PhD - Universidade Federal de Ouro Preto  
Renata Guerra Sá - PhD - Universidade Federal de Ouro Preto  
Daniele Cristina de Aguiar - PhD - Universidade Federal de Minas Gerais

Versão final

Aprovado em 20 de outubro de 2020

De acordo

Professor Orientador Rodrigo Cunha Alvim de Menezes



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes**, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR, em 01/12/2020, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0109330** e o código CRC **B8BBC97F**.

## **APOIO FINANCEIRO**

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

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, pelo apoio concedido em todas as fases da minha vida, em especial a minha mãe por acreditar no poder transformador e enriquecedor do conhecimento.

Agradeço ao meu professor e orientador Dr. Rodrigo Menezes, por abrir as portas do seu laboratório para um “aspirante” jovem cientista, e também por acreditar na minha capacidade para realizar esse trabalho assim como na de pensar e fazer ciência. E ao meu professor e coorientador Dr. Deoclécio Chianca por me receber na equipe do LFC e por incentivar o progresso e o avanço da ciência em nosso laboratório.

Agradeço a minha coorientadora Dr<sup>a</sup> Sylvana Noronha por todo conhecimento passado, puxões de orelhas, conversas descontraídas e criação de jargões repetitivos, a você sou extremamente grato, principalmente por dividir um pouco da sua trajetória científica comigo e de tal modo me inserir nela.

As minhas eternas duplas inseparáveis Géssica e Aline! A vocês sou eternamente grato! A Géssica dupla da graduação, que me acompanha em todos meus passos e me faz sentir forte e conciso em minhas decisões e a Aline dupla da pós da graduação que trilhou e trilha esse caminho comigo deixando tudo mais leve, divertido e desprezioso. Obrigado por toda a ajuda!

A minha amiga Máira, em especial obrigado por me aturar em praticamente todas as horas do dia! E por compartilhar de tanta cumplicidade e cientificidade com a minha pessoa.

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular Mariana, Thayane, Fabiana, Yasmin, Fernanda, Erika, Sabrina, Igor, Gabriela! Obrigado pela ótima recepção e por me fazer tão parte dessa grande equipe! E aos demais professores do laboratório. A Dona Marli e ao Sr. Miltinho pelo cuidado com os animais e cordialidade comigo.

Em especial a minha amiga Aquila, por me ajudar no início desse projeto e me ensinar inúmeros macetes! A você sou grato e agradecido pelo convívio em Ouro Preto, assim como fora dele!

Aos laboratórios de pesquisa que auxiliariam nesse trabalho, em especial ao laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEX).

As repúblicas Tabor e Além da Lenda e seus respectivos moradores (as), por me apresentarem o espírito republicano e demonstrarem que afinal ninguém é feliz sozinho!

A UFOP por me conceder o prazer de ser seu aluno, as agências de fomento que auxiliaram e auxiliam na minha trajetória acadêmica e a cidade de Ouro Preto por me receber tão bem!

A todos envolvidos direta ou indiretamente nesse projeto, obrigado por tanto e por tudo!

*“Palavras são, na minha nada humilde opinião,  
nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de  
formar grandes sofrimentos e também de  
remediá-los”*

*J.K Rowling*

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 16 |
| 1.1 Obesidade: Panorama fisiopatológico e epidemiológico .....                           | 16 |
| 1.2 Alterações metabólicas associadas a obesidade: inflamação e estresse oxidativo ..... | 17 |
| 1.3 Obesidade e neuroinflamação: alterações comportamentais e cognitivas. ....           | 20 |
| 1.4 Hormônios ovarianos e transtornos neuropsiquiátricos.....                            | 21 |
| 1.5 Tratamento dietoterápico para a obesidade .....                                      | 23 |
| <br>   |    |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....   | 28 |
| <br>   |    |
| 2.1 Objetivo Geral. ....   | 28 |
| 2.2 Objetivos Específicos .....  | 28 |
| <br>   |    |
| <b>3 HIPÓTESE</b> .....  | 29 |
| <br>   |    |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 30 |
| 4.1 Modelo Animal.....   | 30 |
| 4.2 Delineamento Experimental .....  | 30 |
| 4.3 Dietas .....   | 31 |
| 4.4 Tratamento .....   | 32 |
| 4.5 Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DH).....                       | 33 |
| 4.6 Eutanásia e coleta de material biológico .....                                       | 33 |
| 4.7 Avaliação do ciclo estral e estratificação do ciclo estral .....                     | 34 |
| 4.8 Testes Comportamentais .....   | 35 |
| 4.8.1 Labirinto em T-elevado (LTE).....  | 36 |
| 4.8.2 Caixa Claro/Escuro .....   | 37 |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.8.3 Campo Aberto .....   | 38        |
| 4.9 Ensaio Biológico .....   | 39        |
| 4.9.1 Análise de íons .....  | 39        |
| 4.9.2 Análise do perfil lipídico.....  | 39        |
| 4.9.3 Análise do desbalanço redox hepático .....   | 40        |
| <b>5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>6 RESULTADOS.....</b>   | <b>44</b> |
| 6.1 O consumo de dieta hiperlipídica por nove semanas é eficiente em induzir obesidade em ratas Wistar, e o tratamento dietoterápico com inulina contém a progressão do aumento de massa gorda ..... | 44        |
| 6.2 O consumo de dieta hiperlipídica associada ao tratamento dietoterápico com inulina induz alterações metabólicas e lipídicas em ratas induzidas a obesidade.....                                  | 49        |
| 6.3 O consumo de dieta hiperlipídica aumenta os níveis de SOD e reduz os de CAT e o tratamento com inulina reverte essas alterações, sem provocar dano hepático em ratas induzidas a obesidade.....  | 51        |
| 6.4 Influência da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica e do estado hormonal sobre as respostas defensivas comportamentais do tipo ansiedade e pânico testadas no Labirinto em T elevado ..... | 52        |
| 6.5 Efeito do tratamento com inulina sobre as respostas defensivas comportamentais do tipo ansiedade e pânico e atividade locomotora de ratas induzidas a obesidade.....                             | 55        |
| <b>7 DISCUSSÃO .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>8 CONCLUSÃO .....</b>   | <b>72</b> |
| <b>9 REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>73</b> |

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Representação esquemática do processo de transição nutricional e epidemiológica .....  | 17 |
| <b>Figura 3.</b> Composição química da Inulina.....   | 26 |
| <b>Figura 4.</b> Delineamento experimental do estudo .....  | 31 |
| <b>Figura 5.</b> Fotomicrografia das Lâminas referente as fases do ciclo estral dos animais .....   | 35 |
| <b>Figura 6.</b> Desenho esquemático do modo de manuseio do animal pelo experimentador durante os testes comportamentais.....                     | 36 |
| <b>Figura 7.</b> Desenho esquemático do aparato LTE .....   | 37 |
| <b>Figura 8.</b> Desenho esquemático do aparato claro escuro.....   | 38 |
| <b>Figura 9:</b> Desenho esquemático do aparato campo aberto .....  | 39 |
| <b>Figura 10.</b> Efeito da DH e do tratamento com inulina sobre o consumo alimentar e calórico por semana nos animais induzidos a obesidade..... | 45 |
| <b>Figura 11.</b> Efeito do consumo de DH/inulina sobre o ganho ponderal e peso final dos animais.....  | 47 |
| <b>Figura 12.</b> Efeito do consumo de DH isolada e em associação ao tratamento com inulina sobre o perfil lipídico dos animais. ....             | 50 |
| <b>Figura 13.</b> Análise da atividade de enzimas do sistema antioxidante e produtos de peroxidação lipídica e proteica no fígado .....           | 52 |
| <b>Figura 14.</b> Labirinto em T elevado- FC e FO. ....   | 53 |
| <b>Figura 15.</b> Labirinto em T elevado de animais submetidas a obesidade em alto e baixo estado hormonal.....                                   | 54 |
| <b>Figura 16.</b> Efeito do tratamento com inulina em ratas induzidas a obesidade e expostas ao LTE .....   | 56 |
| <b>Figura 17.</b> Animais submetidos a Caixa Claro Escuro.....  | 57 |
| <b>Figura 18.</b> Animais submetidos ao campo aberto.....   | 58 |

## Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composição química das dietas utilizadas nos protocolos nutricionais dos animais.....  | 32 |
| <b>Tabela 2.</b> Efeito do consumo de DH e do tratamento com inulina sobre os tecidos abdominais brancos dos animais induzidos a obesidade..... | 48 |
| <b>Tabela 3.</b> Efeito da obesidade e do tratamento com inulina sobre os parâmetros metabólicos de ratas wistar .....                          | 49 |

## **Lista de Abreviaturas**

**DCNT:** Doenças Crônicas não transmissíveis

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**EROS:** Espécies Reativas de Oxigênio

**DC:** Dieta Controle

**DH:** Dieta Hiperlipídica

**AGCC:** Ácidos Graxos de Cadeia Curta

**FO:** Fêmea Obesa

**FC:** Fêmea Controle

**FCI:** Fêmea Controle Inulina

**FOI:** Fêmea Obesa Inulina

**BH:** Baixo Hormônio

**AH:** Alto Hormônio

**PBS:** Salina Tamponada

**TBARS:** Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

**SOD:** Superóxido dismutase

**CAT:** Catalase

**LTE:** Labirinto T-Elevado

**CE:** Claro Escuro

**CA:** Campo Aberto

## RESUMO

A obesidade se caracteriza como uma pandemia moderna com alto impacto epidemiológico para a população. Alterações metabólicas, endócrinas, inflamatórias e comportamentais já são descritas como decorrentes de sua instalação e progressão. Diversas terapias podem ser empregadas para conter o impacto da obesidade, entre elas os tratamentos dietoterápicos, como o uso de fibras. Classificada como uma fibra não fermentável da classe dos fruto-oligosacarídeos, a inulina é encontrada em produtos de origem vegetal e atua como um prebiótico. Seus benefícios se relacionam com a redução do peso através da redução do tecido adiposo (ação na lipogênese e lipólise). Analisar o impacto de uma suplementação com inulina sobre a massa gorda, perfil eletrolítico, status redox no fígado assim como as respostas defensivas comportamentais de ratas wistar induzidas a obesidade pela dieta hiperlipídica. 50 ratas foram divididas em 2 grupos e submetidas a 2 protocolos nutricionais: Dieta Controle (11% de lipídeo) e Dieta Hiperlipídica (45% de lipídeo), do dia 0 ao dia 35, após o dia 35, os dois grupos foram realocados em 4 grupos de acordo com sua dieta e tratamento dietoterápico: Dieta Controle (DC) (PBS); Dieta Hiperlipídica (DH) (PBS); Dieta Controle (Inulina) e Dieta Hiperlipídica (Inulina). O tratamento dietoterápico se constitui de 860mg/kg/ml de inulina diluída em veículo (PBS) ou PBS administrado do dia 36 ao dia 63 via gavagem orogastrica. Após o fim do protocolo nutricional de 63 dias, as ratas foram submetidas aos testes comportamentais: Labirinto em T elevado, Campo aberto e Claro escuro assim como a avaliação do seu ciclo estral. Após o fim dos testes, os animais foram eutanasiados e o tecido adiposo e fígado foram coletados para análises posteriores. Em relação ao consumo alimentar, a inulina foi capaz de aumentar esse parâmetro nos animais que receberam a DC, contudo sem surtir efeito nos animais que receberam a DH. Acompanhando esse aumento, o tratamento dietoterápico também aumentou a ingestão calórica dos animais que receberam DC, quando comparado aos demais grupos. Frente a composição corporal dos animais, a suplementação com inulina reduziu os tecidos adiposos parametrial e inguinal nos animais induzidos a obesidade, assim como também reduziu o índice de adiposidade tanto desses animais, quanto dos animais que receberam a DC. Nas medidas do perfil eletrolítico, a inulina reduziu os valores sanguíneos de sódio e bilirrubina assim como aumentou a concentração de cálcio e magnésio em ambos os grupos (DC e DH). No status redox hepático, a inulina reduziu a atividade da catalase em ambos os grupos

(DC e DH) como reduziu o nível de proteína carbonilada em animais que foram induzidos a obesidade. No que diz respeito as respostas defensivas comportamentais a inulina foi capaz de acentuar o padrão exploratório de ratas que receberam DC, porém sem surtir efeito em animais que consumiram DH. Conclusão: Nossos dados convergem para o melhor entendimento dos efeitos da inulina em um modelo de obesidade, assim como de seus benefícios em indivíduos saudáveis.

## ABSTRACT

Obesity is characterized as a modern pandemic with a high epidemiological impact on the population. Metabolic, endocrine, inflammatory and behavioral changes are already described as resulting from their installation and progression. Several therapies can be used to contain the impact of obesity, including diet treatments, such as the use of fibers. Classified as a non-fermentable fiber of the fructo-oligosaccharide class, inulin is found in products of plant origin and acts as a prebiotic. Its benefits are related to weight reduction through the reduction of adipose tissue (action on lipogenesis and lipolysis). Analyze the impact of inulin supplementation on fat mass, electrolyte profile, liver redox status as well as the behavioral defensive responses of wistar rats induced by obesity by the high-fat diet. 50 rats were divided into 2 groups and subjected to 2 nutritional protocols: Control Diet (11% lipid) and High Fat Diet (45% lipid), from day 0 to day 35, after day 35, the two groups were relocated into 4 groups according to their diet and dietary treatment: Control Diet (DC) (PBS); High Fat Diet (DH) (PBS); Control Diet (Inulin) and High Fat Diet (Inulin). The diet therapy treatment consists of 860mg / kg / ml of diluted inulin in vehicle (PBS) or PBS administered from day 36 to day 63 via orogastric gavage. After the end of the 63-day nutritional protocol, the rats were subjected to behavioral tests: elevated T maze, open field and dark light as well as the evaluation of their estrous cycle. After the end of the tests, the animals were euthanized and the adipose tissue and liver were collected for further analysis. Regarding food consumption, inulin was able to increase this parameter in animals that received CD, however without having an effect on animals that received HFD. Accompanying this increase, dietary treatment also increased the caloric intake of animals that received CD, when compared to the other groups. In view of the animals' body composition, supplementation with inulin reduced the parametrial and inguinal adipose tissues in animals induced by obesity, as well as reduced the adiposity index both of these animals and of the animals that received CD. In the measurements of the electrolytic profile, inulin reduced the blood values of sodium and bilirubin as well as increased the concentration of calcium and magnesium in both groups (DC and DFH). In hepatic redox status, inulin reduced catalase activity in both groups (DC and DFH) as it reduced the level of carbonylated protein in animals that were induced to obesity. Regarding defensive behavioral responses, inulin was able to accentuate the exploratory pattern of rats that received CD, but without having an effect on animals

that consumed HFD. Conclusion: Our data converge for a better understanding of the effects of inulin in an obesity model, as well as its benefits in healthy individuals.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Obesidade: Panorama fisiopatológico e epidemiológico

Definida e classificada como doença pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na década de 50 (WHO, 2018), a obesidade desde então é considerada uma pandemia moderna tendo um grande impacto epidemiológico para a população, apresentando altas taxas de incidência e prevalência em nível global (Jayne et al., 2020). Caracterizada pelo aumento do tecido adiposo, a obesidade pode ser causada pelo desbalanço energético entre o número de calorias consumidas *versus* o débito energético, sua gênese tem etiologia multifatorial tendo como suas causas principais fatores ambientais, genéticos, culturais e sociais (Jaccks et al., 2019).

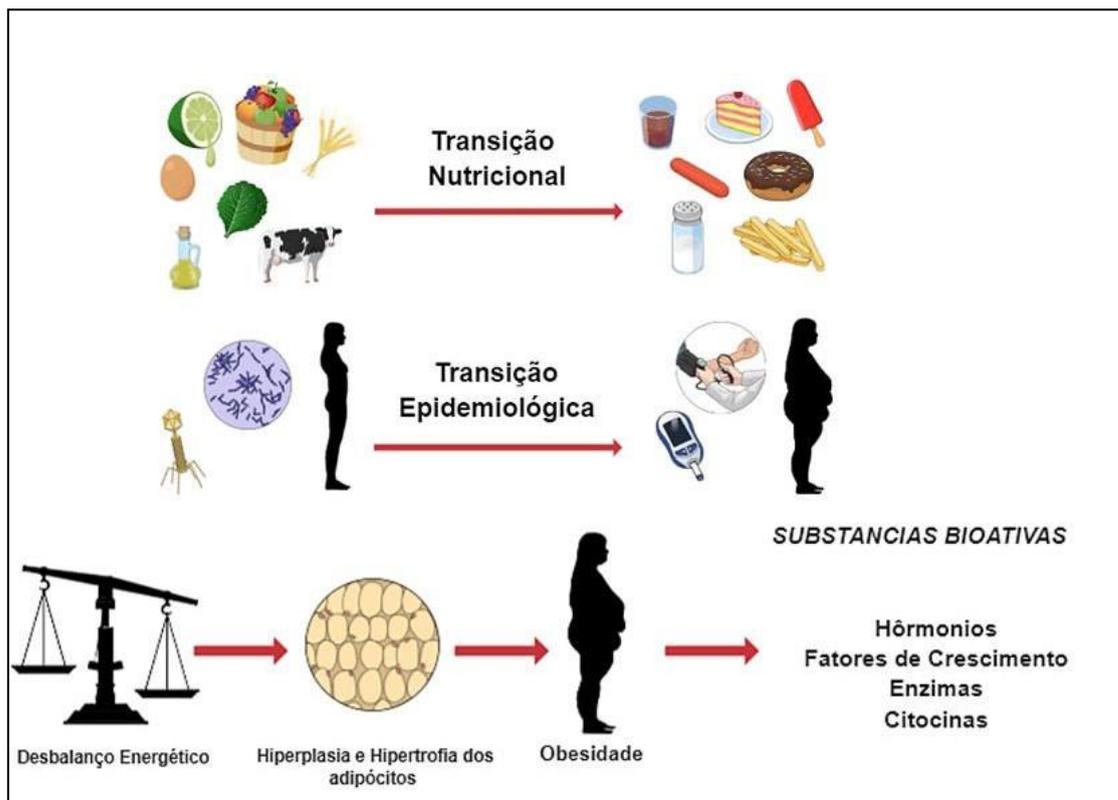
O processo fisiopatológico da obesidade se constitui de uma progressão crônica do aumento do peso associada a alterações metabólicas e fisiológicas. Nesse contexto o aumento do peso está intrinsecamente relacionado ao aumento do tecido adiposo, levando dessa forma a um acúmulo excessivo de gordura (Jaccks et al., 2019). Alterações em hormônios intestinais, hepáticos e reguladores da saciedade em circuitos neurais também são utilizados para auxiliar na definição e diagnóstico da obesidade (Meldrum et al., 2019). Contudo, ao nível clínico uma medida que vem sendo utilizada na classificação da obesidade é o índice de massa corporal (IMC), que leva em consideração a altura e o peso do indivíduo. Índices maiores que 30 Kg/m<sup>2</sup> recebem o diagnóstico clínico de obesidade, que nesse contexto se limita apenas a detecção do aumento de massa corporal e não do percentual ou distribuição de gordura (NCD, 2016).

O padrão alimentar está intrinsecamente relacionado a homeostase energética assim como na gênese e progressão da obesidade. A composição nutricional da dieta adotada é capaz de impactar o metabolismo energético assim como o comportamento alimentar (Swinburn et al., 2019). Nos últimos anos tem se presenciado em nível global um consumo exacerbado de alimentos com alta densidade calórica ricos em gorduras., açúcares e sal. O aumento das taxas de incidência e prevalência da obesidade e sobrepeso, tem relação com dois processos congruentes de transição, a saber: a transição nutricional e a transição epidemiológica (Batal et al., 2018).

A transição nutricional retrata as mudanças nos padrões alimentares da população no que tange sua composição e origem. Nota-se que o passar dos anos o

padrão alimentar se modificou, passando de alimentos *in natura* e sem nenhum processamento para alimentos ultraprocessados, acrescidos de conservantes, corantes, realçadores de sabor assim como alimentos compostos de uma alta densidade calórica, ricos em gorduras saturadas, trans, açúcares e sal. Não obstante, o processo de transição nutricional, impacta de maneira expressiva o quadro de saúde/doença da população dando origem a outro processo : a transição epidemiológica (Popkin, 2015).

A transição epidemiológica diz respeito ao padrão de acometimento da população a determinados índices de doenças, uma vez que a décadas atrás as doenças infecto contagiosas além de serem mais incidentes, representavam altas taxas de mortalidade para os indivíduos (Batal et al., 2018). Contudo, com a mudança no padrão alimentar aliada ao modo de vida contemporâneo, atualmente tem se presenciado em nível mundial o aumento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como a hipertensão, diabetes tipo 2 e a obesidade.



**Figura 1.** Figura esquemática do processo de transição nutricional e epidemiológica e fisiopatologia da obesidade Fonte: Figura criada utilizando a plataforma *Mind the Graph* ([www.mindthegraph.com](http://www.mindthegraph.com)).

Classificada como uma das DCNTs mais incidentes na população a nível global, a obesidade é caracterizada como uma pandemia moderna afetando milhões de pessoas ao ano. De acordo com a OMS, estima-se que um a cada oito adultos jovens é obeso, e projeções futuras apontam que em 2025 cerca de 2,3 bilhões de pessoas apresentem sobrepeso, sendo que destas, mais de 700 milhões serão obesas (WHO, 2018). Dados brasileiros, apontam um crescimento exponencial das taxas de obesidade no país, dados da pesquisa de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (Vigitel), apontaram que houve aumento de 67,8% do índice de obesidade nos últimos anos, saindo de um percentual de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018. Em relação as estratificações por gênero, no ano de 2018 as mulheres apresentaram índices maiores de obesidade, 20,7%, em relação aos homens, 18,7% (VIGITEL, 2019).

O desbalanço energético positivo que dá origem a obesidade é o gatilho inicial para a desregulação do circuito metabólico e homeostase energética. As calorias consumidas em excesso são armazenadas na forma de tecido adiposo. As células do tecido adiposo (os adipócitos) sofrem processos celulares como a hiperplasia (aumento do número de células) e a hipertrofia (aumento do tamanho das células) regulados pela captação e armazenamento de energia na forma de lipídeos (Zhang, Chua; 2011). O tecido adiposo é responsável por regular mecanismos metabólicos através da produção de fatores de crescimento, enzimas e citocinas que também participam do processo de regulação energética (Blüher et al., 2019)

A produção exacerbada de substâncias bioativas é capaz de desregular vias metabólicas envolvidas na autorregulação do armazenamento energético assim como são capazes de ativar vias centrais envolvidas no controle do consumo alimentar situadas no sistema nervoso central (SNC). A leptina é a principal substância bioativa envolvida na via da homeostase energética assim como na obesidade, atuando na regulação de vias centrais através da produção de neuropeptídios atuantes no SNC como o Neuropeptídio Y, a Proopiomelanocortina (POMC) e a proteína relacionada ao gene Agouti (AgRP) (Myeres et al., 2008). Do mesmo modo, a leptina pode atuar em outras vias adjacentes como a via dos hormônios intestinais (PYY e grelina) e hormônios hepáticos (insulina e glucagon).

## **1.2 Alterações metabólicas associadas a obesidade: inflamação e estresse oxidativo**

O aumento do tecido adiposo, juntamente com outros mecanismos adjacentes funcionam como indutores da resposta inflamatória. A expansão tecidual do tecido adiposo associada as desregulações dos níveis centrais de leptina, altera suas propriedades metabólicas, gerando um quadro de hipóxia e conseqüentemente contribuído para o processo de inflamação (Apostolopoulos et al., 2016). Nesse contexto há uma migração de células imunológicas, para o tecido adiposo, atraídas pelos quimioatratores secretados por produtos do estresse celular (Zhou et al., 2020). Desde modo, células imunológicas como os macrófagos, atuam como imunomoduladoras na estimulação da produção de citocinas anti-inflamatórias pelos adipócitos e na neutralização das citocinas pró-inflamatórias, ainda a nível tecidual, buscando balancear a resposta inflamatória sistêmica (Brimelow et al., 2017).

A elevada produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-6, IL-1, TNF-, entre outras) associada a desregulação e expansão do tecido adiposo, induz a um quadro de inflamação, esse que é descrito na literatura como um quadro de inflamação, crônica sistêmica e de baixo grau (Galmes et al., 2019). Essa nomenclatura, diz respeito a inflamação ocasionada pela obesidade, não apresentar os sinais típicos de uma inflamação comum, mas que é semelhante aos demais quadros inflamatórios por compartilhar os mesmos distúrbios gerados pelos mediadores celulares assim como a ativação das mesmas vias de sinalização intracelular (Brimelow et al., 2017).

O quadro de inflamação crônica e de baixo grau é descrito na literatura como um dos principais causadores de doenças metabólicas e imunológicas como a Diabetes tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares, resistência à insulina, síndrome metabólica, doença hepática gordurosa não alcoólica assim como disbiose intestinal (Asghar, Sheikh; 2017). Devido a ativação de vias de sinalização intracelular, o quadro de obesidade, aliado a produção de citocinas pró-inflamatórias também induz a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), ocasionando dessa forma o aumento do estresse oxidativo celular e tecidual, esse que também contribui para a gênese de distúrbios metabólicos (Vicent, Taylor; 2005).

O estresse oxidativo celular e tecidual assim como os danos oxidativos provocados, estão associados a um excesso da oferta de redutores (ou seja, elétrons) das vias metabólicas. Índices, como os altos níveis de glicose ou de lipídios

circulantes, podem resultar em um suprimento excessivo de substratos energéticos às vias metabólicas a nível celular, aumentando dessa forma a produção de EROS (Mcmurray et al., 2015). Embora as EROS, sejam moléculas de sinalização essencial para a homeostase dos sistemas biológicos, se não forem bem controladas, podem causar danos a proteínas, lipídios e DNA. Na maioria dos tipos celulares, a mitocôndria é o local mais importante na produção de EROS, pois nesta organela ocorrem numerosas reações de transferência e redução de elétrons. O excesso de oferta de elétrons na cadeia de transporte de elétrons é o fator principal para a formação desproporcional de altos níveis de EROS (Matsuzawa-Nagata et al., 2008)

O estresse oxidativo e os danos as biomoléculas ocorrem ao longo do ciclo vital sendo mais pontuais no processo de envelhecimento, no entanto, na literatura já são descritos que processos de disfunção metabólica também contribuem para o aumento e acúmulo de EROS (Mcmurray et al., 2015). Altos índices de estresse oxidativo, já foram descritos em modelos experimentais de diabetes tipo 2, doença de Alzheimer, hipertensão e obesidade. Diversos estudos evidenciaram altos níveis de biomarcadores de dano oxidativo em modelos de obesidade e outras doenças metabólicas, achados como a peroxidação lipídica e proteica foram descritos nesses modelos (Freeman et al., 2014).

Para a proteção celular e tecidual contra as EROS, o organismo dispõe de um sistema de defesa antioxidante, dividido em duas vertentes: O enzimático e o não enzimático (Vicent, Taylor; 2005). O sistema antioxidante enzimático é composto de enzimas com atividade antioxidantes que são capazes de neutralizar as EROS através de reações de oxirredução. Entre as enzimas do sistema antioxidante enzimático estão: a Superóxido Dismutase (SOD) - metaloenzima que catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), Catalase (CAT)- que atua na redução de  $H_2O_2$  em duas moléculas de água e uma de oxigênio e Glutathione Peroxidase- que catalisa a reação com oxidação de duas moléculas de glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG) (Murphy, 2009). Já o sistema antioxidante não enzimático é composto por outras biomoléculas de fonte endógena ou exógena como os antioxidantes (ácido ascórbico, ácido úrico, vitamina E, dentre outros) e as proteínas (por exemplo, albumina e a transferrina) (Balaban, 2005) . Evidências demonstram que o quadro de obesidade além de ativar a via de inflamação, e aumentar a produção de EROS, é capaz de desregular o sistema antioxidante

enzimático, podendo levar a danos proteicos e lipídicos em órgãos como o encéfalo, rins, pulmão e fígado (Vicent, Taylor; 2005).

Frente aos danos causados pela produção exacerbada das EROS, os danos lipídicos podem estar associados ao quadro de obesidade. A oxidação de lipídios pode alterar as propriedades celulares dos órgãos e tecidos, principalmente suas membranas celulares, causando alterações nas proteínas intracelulares assim como no DNA (Gaschle; Stockwel, 2017). Não obstante, a peroxidação lipídica também está relacionada com a geração, progressão e regulação da resposta inflamatória e até mesmo neuroinflamatória como nos casos de doenças neurodegenerativas do SNC, como o Alzheimer (Gaschle; Stockwel, 2017). Aumento da peroxidação lipídica já é descrito em modelos de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, sendo relacionado a um aumento da resposta inflamatória e apoptose celular (Lasker et al., 2019; Ngamlerst et al., 2019). Frente ao processo de peroxidação lipídica, acredita-se que esse seja mais acentuado nos homens, que nas mulheres uma vez que os hormônios femininos (principalmente o estradiol) atuarem como antioxidantes endógenos, modulando a expressão gênica de genes relacionados a resposta antioxidante como a SOD, CAT e GPx (Vuković et al., 2014).

### **1.3 Obesidade e neuroinflamação: alterações comportamentais e cognitivas**

A liberação de citocinas pró-inflamatórias e as EROS pode danificar neurônios saudáveis, causando disfunção sináptica, perda de sinapses e morte neuronal. Portanto, um desequilíbrio entre funções pró-inflamatórias e repostas anti-inflamatórias das células neuroimunes podem resultar em lesões no SNC (Schain et al., 2017). Não se limitando a uma inflamação crônica, sistêmica e de baixo grau, as citocinas circulantes na corrente sanguínea alcançam o SNC, após ultrapassarem a BHE e se instalam em áreas encefálicas específicas como o hipocampo e hipotálamo causando focos de neuroinflamação. Esse mesmo processo de inflamação, também contribui para a ativação da micróglia e reatividade de astrócitos no SNC (Samara et al., 2019).

Focos de inflamação em modelos de obesidade já foram descritos no hipotálamo (Noronha et al., 2019) e hipocampo, onde se observou um aumento da

expressão de citocinas pro inflamatórias como a IL1 $\beta$ , IL-6, e TNF assim como uma maior infiltração, ativação e proliferação da microglia e astrócitos nessas áreas (Gomes et al., 2019; Guillemot-Legrís et al., 2017; Valcarcel-Ares et al., 2019). Esses achados já foram observados tanto em humanos obesos quanto em modelos experimentais para estudo da obesidade, e possuem uma ligação direta com gênese dos transtornos neuropsiquiátricos.

Estudos relatam associações positivas em indivíduos obesos entre estado inflamatório e os déficits cognitivos assim como alterações no humor. (Sellbom e Gunstad, 2012; Sweat et al., 2008. Capuron et al., 2008). Por outro lado, processo de perda de peso estão associados à uma redução da inflamação periférica e melhoria significativa do estado emocional (Capuron et al., 2010; Emery et al., 2007). Modelos de obesidade em roedores mostraram que a inflamação existente no cérebro através do aumento da expressão de citocinas, particularmente em áreas na regulação do humor e na formação da memória, como o hipocampo (Dinel et al., 2011, 2014) o córtex ou hipotálamo associada ao aumento do comportamento emocional e comprometimentos cognitivos

Nos últimos os anos, estudos relacionados ao processo de obesidade não se limitaram apenas em desvendar os mecanismos relacionados a seu impacto frente as alterações metabólicas e a instalação de DCNTs. Vertentes relacionadas a investigar as bases neurobiológicas da obesidade e sua relação com as alterações cognitivas e comportamentais ganharam evidência nas últimas décadas. Os modelos de obesidade tanto induzida pela dieta, quanto os geneticamente modificados, já são largamente utilizados no estudo dos transtornos neuropsiquiátricos e anormalidades cognitivas. Nesse contexto, a obesidade está associada a uma ampla variedade de alterações comportamentais incluindo nestas a ansiedade, depressão e o pânico assim como a alterações cognitivas como dificuldade no aprendizado e cognição, associadas a piores performances na memória espacial, temporal e de longo prazo (Castanon et al., 2015).

#### **1.4 Hormônios ovarianos e transtornos neuropsiquiátricos**

Os hormônios femininos se caracterizam como a principal fonte de estrógeno e progesterona durante a vida sexual e reprodutiva das mulheres. A cascata biológica para sua produção, tem início no metabolismo do colesterol, passando pela

transformação e conjugação em seus metabólitos ativos até chegar em sua forma final: O estradiol (Coldsammler et al., 2018). Sua secreção corresponde ao eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise-ovariano, e suas flutuações de concentração regulam dessa forma o ciclo menstrual nas mulheres e o ciclo estral nos mamíferos e pequenos roedores (Marques et al., 2016).

Com funções bem elucidadas na literatura os hormônios ovarianos atuam principalmente na regulação da função reprodutiva e sexual das mulheres, contudo eles participam da manutenção e regulação de outras funções biológicas como manutenção da elasticidade da epiderme, dilatação dos vasos sanguíneos e influencia no controle da pressão arterial, assim como na atuação frente as funções cerebrais (Ramos-Ortolaza et al., 2017). Frente o funcionamento do SNC, o estradiol exerce efeitos neuroprotetores capazes de influenciar a plasticidade sináptica, estimular a sobrevivência neuronal, modular marcadores sinápticos e tráfico de neurotransmissores relacionados à cognição do mesmo que tem participação das respostas comportamentais relacionadas a depressão e ansiedade (Villa et al., 2016).

As flutuações nas concentrações de estrogênio, já são descritos na literatura como fatores influenciadores nas modulações das respostas comportamentais, tanto em humanos, quanto em modelos experimentais (Horts et al., 2012). Áreas encefálicas como o hipocampo e amígdala exibem uma alta expressão de receptores de estrogênio, que dessa forma respondem as flutuações de concentração regulados, pelo ciclo menstrual/estral (Leeners et al., 2017).

Nosso grupo de pesquisa, vem investigando a participação dos hormônios ovarianos na gênese de transtornos psiquiátricos como a ansiedade e depressão. Campos et al., 2018 em seu estudo demonstrou que a redução de hormônios ovarianos induzidas pela restrição alimentar, foi capaz de modular respostas defensivas comportamentais relacionadas a ansiedade, promovendo um estado ansiogênico nas ratas, já a administração de estradiol no Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) foi capaz de atenuar esse efeito nas ratas submetidas a restrição alimentar. Do mesmo modo ainda em nosso grupo de pesquisa, Campos et al., 2019 demonstrou que a privação hormonal cirúrgica induzida pela ovarioctomia foi capaz de induzir respostas defensivas comportamentais do tipo ansiedade assim como déficits cognitivos.

Alguns fatores sexo/dependente tem influências sobre a gênese dos transtornos neuropsiquiátricos. As flutuações hormonais, contribuem para que a prevalência desses transtornos seja maior nas mulheres, prioritariamente em

mulheres durante os períodos reprodutivos sugerindo que níveis elevados e cíclicos dos hormônios sexuais poderiam predispor as mulheres em idade reprodutiva a desenvolver transtornos mentais (Krolick et al., 2018). Além disso grandes quedas de estrogênio durante os períodos da menopausa ou pós-parto também sugerem um aumento da propensão para o desenvolvimento de transtornos mentais. Desta forma constata-se que a influência dos hormônios pode atuar de forma bidirecional, dependente de concentração (Leeners et al., 2017)

Mesmo possuindo uma alta taxa de incidência clínica frente aos transtornos neuropsiquiátricos nas mulheres, em modelos experimentais ainda pouco se sabe sobre os mecanismos inerentes as alterações comportamentais em fêmeas. Dado, tanto a uma expressão genética e epigenética diferenciada entre machos e fêmeas (cromossomos XY e XX), o que impacta de maneira importante a expressão gênica dos sistemas biológicos, na literatura já são descritas alterações frente as funções e modulações principalmente relacionados ao SNC (Morrew et al., 2012; Donner, Lowry; 2013). Os circuitos serotoninérgicos já são elucidados como um fator que é diferenciado em machos e fêmeas, uma vez que os neurônios desses circuitos possuem alta abundância de receptores de estrogênio, fazendo que esse sistema seja susceptível as flutuações hormonais. Desde modo acredita-se que as fêmeas apresentem respostas de vulnerabilidade ao stress, e ao pânico de forma diferente aos machos (Donner, Lowry; 2013).

Outras mudanças morfofisiológicas também já são elucidadas na literatura, como as medidas do metabolismo serotoninérgico, que são maiores nas fêmeas que nos machos, já que esse metabolismo é influenciado pelo estrógeno, uma vez que esse hormônio participa do metabolismo da serotonina através da modulação da expressão da enzima triptofano hidroxilase (Tph2) (Krolick et al., 2018; Morrew et al., 2012). Circuitos neurais além de responderem as diferenças hormonais, podem responder a concentração central e periférica dos neuroesteróides (moléculas químicas oriundas do metabolismo do colesterol) um dos neuroesteróides que recentemente vem sendo estudado na literatura e a Allopregnanolona.

Dados da literatura demonstraram que elevados níveis de alopregnanolona estão associados ao aumento na ingestão de alimentos, na preferência por alimentos ricos em energia assim como no processo de progressão da obesidade evidenciado pelo aumento do peso corporal (Sculle, Nothderfter; 2014; Pibiri et al., 2008; Holmberg et al., 2018. Wu, Burnham; 2018). Desde modo acredita-se que os níveis de

allopregnanolona estejam elevados em indivíduos obesos, e que esses níveis aliados as flutuações hormonais participem efetivamente das respostas comportamentais.

### **1.5 Tratamento dietoterápico para a obesidade**

Frente ao impacto fisiológico e social da obesidade, inúmeros estudos buscam tratamentos que visem reduzir ou minimizar suas consequências deletérias. Em relação a farmacoterapia, inúmeros são os fármacos que buscam de certa forma impactar alguma via relacionada a indução ou a progressão da obesidade, como os anorexígenos, redutores de peso, eliminadores de gordura ou até mesmo os antidepressivos (Bessesem, Van Gaal; 2018). Contudo, a farmacoterapia da obesidade não deve englobar apenas aspectos biológicos, e sim ser baseada na mudança do estilo de vida aliada a adoção de hábitos alimentares saudáveis. Nesse aspecto tratamento dietoterápicos não farmacológicos, tem ganhado relevância para o seu tratamento, uma vez que além de apresentarem benefícios concisos a sua sintomatologia e alterações, apresentam menor potencial de provocar efeitos colaterais quando comparados a fármacos alvos que já são utilizados para o tratamento dessa patologia.

Nesse contexto o uso de fibras, pode ser um ótimo alvo dietoterápico para o tratamento da obesidade. A ingestão de fibras alimentares vem sendo estudada ao longo dos anos, sendo que suas propriedades promovem uma série de benefícios aos sistemas biológicos. A OMS recomenda a ingestão de 27 a 40 g de fibra ao dia, essas que podem ser dirigíveis ou não pelo organismo humano (Gupta et al., 2019). Nesse sentido a inulina se caracteriza como uma forte candidata para a depleção das consequências deletérias relacionadas a obesidade (Shoib et al., 2016). Classificada como uma fibra não dirigível, fermentável e rica em açúcar, da classe dos fruto-oligossacarídeos, a inulina é encontrada em produtos de origem vegetal como nas raízes da chicória, alcachofra, aspargos, alho-poró, cebola, banana, trigo e alho. Possui em sua estrutura de 1 a 70 unidades de frutose quem podem estar ligadas a uma molécula terminal de sacarose (Dos Reis et al., 2015; Shoib et al., 2016). Apresenta em sua composição química, uma configuração de  $\beta$  carbono anomérico ligado a 2 monômeros de frutose, fazendo que essas moléculas se tornem resistentes a hidrólise por enzimas digestivas no trato gastrointestinal como mostra a figura 3.

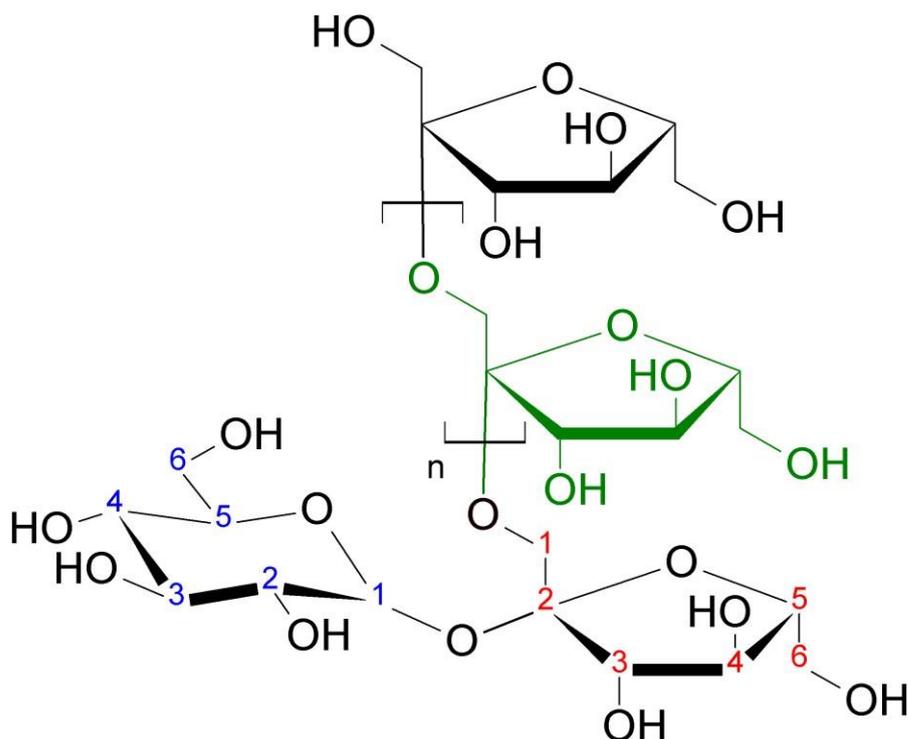


Figura 3: Composição química da Inulina.

Fonte: Adaptação de Reis et al., 2015.

Devido a sua composição e estrutura química, a inulina quando ingerida não sofre hidrólise pela porção superior do Trato Gastrointestinal (TGI) superior, fazendo que não ocorra a digestão. Deste modo, ela percorre o TGI onde no colón sofre fermentação bacteriana pela microflora instestinal, principalmente pelas *Bifidobactérias*, onde assume a função de prébiotico (composto alimentar com propriedades de aumentar a produção bacteriana). A maioria dos benefícios da ingestão de inulina, estão relacionadas ao seu papel fermentável e probiótico. Seus benefícios se relacionam com redução do perfil lipídico e glicêmico (papel hipocolesterolêmico e hipoglicêmico) efeitos na constipação e frequência das fezes, modulação da microbiota intestinal através de seu efeito bifidogênico (aumento de *Bifidobactérias*), redução do risco de doenças gastrointestinais, aumento da absorção do cálcio, magnésio e ferro, aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como o acetato, propionato e butirato assim como sua atuação na redução do peso através da redução do tecido adiposo (ação na lipogênese e lipólise) (Mistry et al., 2018; Mensink et al., 2015; Shoaib et al., 2016; Fan; Cao; Zhang, 2016). Inúmeros são os benefícios da administração de inulina para os sistemas biológicos,

contudo frente a seu papel em relação as alterações comportamentais, pouco se sabe sobre seu efeito.

Em nosso grupo de pesquisa, Abreu et al., 2016 e Noronha et al., 2018 e 2019, demonstram que um protocolo nutricional com uma DH por nove semanas foi capaz de induzir obesidade em ratos Wistar, exercer efeito sobre os parâmetros termoregulatórios, alterar os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) frente ao estresse emocional, além de alterar as respostas defensivas comportamentais relacionadas a ansiedade possivelmente por mecanismos relacionados ao comprometimento GABAérgico no HDM. Diante do exposto, nosso intuito com esse trabalho foi investigar se o consumo de DH por nove semanas também é capaz de impactar o ganho de peso e induzir obesidade em fêmeas a nível de interferir nas respostas defensivas comportamentais de ratas Wistar induzidas a obesidade. E se o tratamento dietoterápico com inulina modifica essas alterações.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar o impacto do consumo de DH associado ao tratamento dietoterápico com inulina, sobre as alterações metabólicas, hormonais e respostas defensivas comportamentais de ratas Wistar induzidas a obesidade.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a eficiência do protocolo nutricional (DH-45%/9 semanas) na indução de obesidade em ratas;
- Avaliar se o consumo de DH associada ao tratamento dietoterápico como inulina modifica os índices de massa gorda e de consumo alimentar de ratas Wistar induzidas a obesidade;
- Avaliar a influência da obesidade induzida pela DH, associada ao tratamento dietoterápico com inulina sobre os parâmetros metabólicos e perfil lipídico dos animais;
- Avaliar o desbalanço redox hepático de ratas induzidas a obesidade e submetidas ao tratamento dietoterápico com inulina;
- Avaliar se as ratas induzidas a obesidade, em comparação as ratas controles, apresentam alterações comportamentais no teste do labirinto em T-elevado (LTE), caixa claro/escuro (CE) e campo aberto (CA);
- Avaliar se a obesidade impacta o estado hormonal e atua sobre as respostas defensivas comportamentais;
- Avaliar se o tratamento dietoterápico com inulina modifica as respostas defensivas comportamentais.

### **3 HIPOTESE**

Investigar se o consumo de DH por nove semanas é capaz de impactar o ganho de peso e induzir obesidade em fêmeas a nível de interferir nas respostas defensivas comportamentais de ratas Wistar induzidas a obesidade. E se o tratamento dietoterápico com inulina modifica essas alterações.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Modelo Animal

Neste estudo foram utilizadas 50 ratas da linhagem Wistar provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto. Os procedimentos realizados nos animais utilizados neste estudo, tiveram aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo nº 8744280818 assim como seguiram as diretrizes da Lei Arouca (nº 11.794). Os animais foram adquiridos com idade média entre 4 a 6 semanas, pesando aproximadamente de  $90 \pm 110$ g e permaneceram alojados em caixas acrílicas (41cm de comprimento X 34 de largura X 17 de altura) no biotério de manutenção do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC). A oferta de dieta, seja ela a dieta controle (DC; Nuvilab®) ou a dieta hiperlipídica (DH) e água, foi ofertada livremente para todos os grupos experimentais durante todo o protocolo experimental. Os animais permaneceram em temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ$  C), sob o ciclo claro/escuro de 12 horas.

### 4.2 Delineamento Experimental

Ratas Wistar fêmeas de aproximadamente 4 a 6 semanas, foram randomicamente divididos de acordo com seu protocolo nutricional e o tratamento dietoterápico. Dando origem aos grupos: Fêmea Controle/Veículo (PBS), Fêmea Obesa/ Veículo (PBS); Fêmea Controle/Inulina e Fêmea Obesa/Inulina. As fêmeas foram submetidas ao protocolo nutricional de 63 dias e a partir do dia 35 do protocolo nutricional, iniciou-se o tratamento com veículo (PBS) ou inulina (860mg/ml/kg) via gavagem orogastrica. Os animais tiveram mensuração do peso e do consumo alimentar semanalmente. Ao fim do protocolo nutricional no dia 63, os animais foram submetidos ao processo de habituação ao experimentador e posteriormente foi realizado a bateria de testes comportamentais, seguido de avaliação do ciclo estral e eutanásia. A figura ilustra o cronograma seguido no estudo.

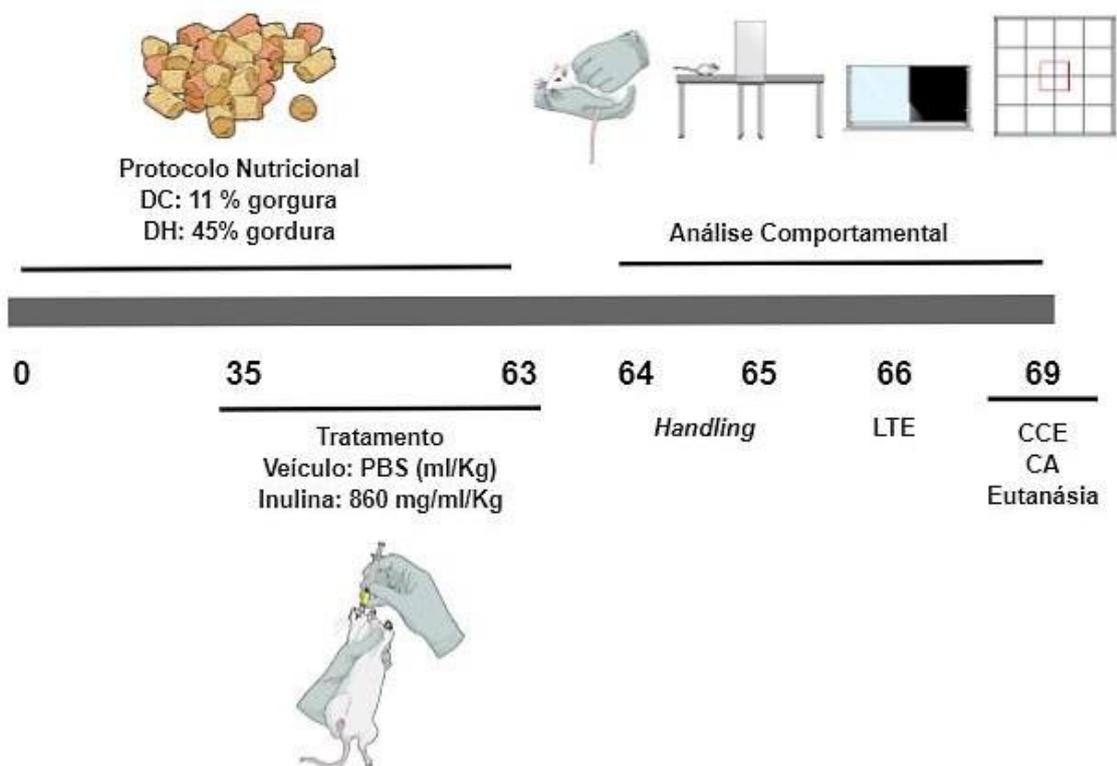


Figura 4: Delineamento experimental do estudo.

Fonte: Figura criada utilizando a plataforma *Mind the Graph* ([www.mindthegraph.com](http://www.mindthegraph.com)).

### 4.3 Dietas

Os animais foram randomicamente divididos de acordo com seu protocolo nutricional. Neste estudo foram utilizadas duas dietas distintas. A DH (45% de lipídeo kcal/g), desenvolvida pelo Laboratório de Fisiologia Cardiovasculare produzida de forma comercial pela empresa *PragSoluções - Biociências, Comércio & Serviços Ltda* com base na fórmula D12451 do laboratório *Research Diets, Inc.*, sendo o total de calorias da sua composição equivalentes a 481 kcal/100g (Abreu et al., 2014; de Noronha et al., 2019). Já a DC (11% de lipídeo kcal/g) trata-se da ração comercial para biotério NUVILAB®, apresentando em sua composição um total de 348 kcal/100g. A composição química das dietas utilizadas se encontra na tabela abaixo:

Tabela 1: Composição química das dietas utilizadas nos protocolos nutricionais dos animais.

| DH* (45% Lipídeo)             | g/Kg        | Kcal/g      | DC** (11% Lipídeo)   | g/Kg        | Kcal/g      |
|-------------------------------|-------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|
| Colina                        | 2.5         | 0           | Proteína             | 220         | 880         |
| Mix de Vitaminas <sup>1</sup> | 10          | 0           | Celulose             | 80          | 0           |
| Mix de Vitaminas <sup>2</sup> | 35          | 0           | Lipídeos             | 40          | 360         |
| Celulose                      | 50          | 0           | Carboidratos         | 560         | 2240        |
| Maltodextrina                 | 115         | 460         | Vitaminas e Minerais | 50          | 0           |
| Amido                         | 127.5       | 510         | Umidade              | 50          | 0           |
| Sacarose                      | 200         | 800         | -                    | -           | -           |
| Caseína                       | 220         | 880         | -                    | -           | -           |
| Banha                         | 200         | 1800        | -                    | -           | -           |
| Óleo de Soja                  | 40          | 360         | -                    | -           | -           |
| <b>Total</b>                  | <b>1000</b> | <b>4810</b> |                      | <b>1000</b> | <b>3480</b> |

\*Dieta hiperlipídica (PRAG Soluções Comércio e Serviços em Biociências®; DH 45% gordura kcal/kg; baseado na fórmula D12451; Research Diets, Inc.); \*\*Dieta controle (NUVILAB CR1-NUVITAL®; dieta padrão 11% gordura kcal/kg). **1Mistura de minerais (g/Kg de mistura):** Na Cl – 139,3 / KI – 0,79 / MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 57,3 / CaCO<sub>3</sub> – 381,4 / MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O – 4,01 / FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 27,0 / ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,548 / CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O – 0,477 / CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O – 0,023 / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 389,0. **2Mistura de vitaminas (g/Kg de mistura):** Acetato de retinol – 0,6 / Colecalciferol – 0,005 / Ácido p-aminobenzóico – 10,00 / I-Inositol – 10,00 / Niacina – 4,00 / Pantotenato de cálcio – 4,00 / Riboflavina – 0,80 / Tiamina HCl – 0,50 / Piridoxina HCl – 0,50 / Ácido fólico – 0,20 / Biotina – 0,04 / Vitamina B12 – 0,003 / Sacarose – q.s.p. 1000. / Colina – 200,0 / Tocoferol – 6,7.

#### 4.4 Tratamento

O tratamento com inulina (Inulin Fructo-Oligosaccharides (FOS); *Comfort Click, United Kingdom*) foi realizado do dia 42 a 63 do protocolo nutricional via gavagem orogástrica (nos grupos FCI e FOI). A inulina foi utilizada na dosagem de 860mg/kg/ml diluída em PBS (Romo-Araiza, 2018; Milla et al. 2017) conforme dosagens já descritas na literatura. A composição nutricional do composto utilizado compreende a cada 5 g de composto uma maior parte de fibras: 4,5 K/cal e menor de carboidratos: 0.4 K/cal. O veículo se constitui de PBS (salina tamponada com fosfato; pH7,2): a solução foi preparada a partir da diluição de 8,18g de NaCl P.A (SIGMA-ALDRICH, USA), 1,98g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O P.A. (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH, Brasil) e 0,26g de

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O P.A. (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH, Brasil) em água ultra-purificada (Milli – Q®) q.s.p. 1000mL. O pH (Sensoglass, Sensores Analíticos – Modelo SC02) da solução foi ajustado para 7,2 com soluções de HCl e NaOH, conforme necessidade. A solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C e 1,0 Kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos, conforme protocolo em vigor no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular.

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

Para verificar a eficácia da DH (45% de lipídeo), em induzir obesidade em fêmeas, neste trabalho foi mensurado o peso corporal final dos animais, assim como seu ganho de peso semanal e ganho de peso geral. Após o fim do protocolo comportamental, os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos a dissecação do tecido adiposo abdominal (TAB), parametrial, retroperitoneal e inguinal. Os valores expressos desses tecidos, representam um índice importante para avaliação da obesidade neste trabalho. Análises comparativas entre os animais que receberam as diferentes dietas (DC e DH), assim como os grupos tratados com o tratamento dietoterápico com inulina (DCI e DHI) foram propostas através do cálculo do índice de adiposidade (IA) dos animais [obtido pela fórmula  $MG \text{ (massa gorda)} \times 100/PCF \text{ (peso corporal final)}$ ] previamente estabelecido por nosso grupo de pesquisa (Abreu et al., 2014; de Noronha et al., 2019).

#### **4.6 Eutanásia e coleta de material biológico**

Após o fim do protocolo comportamental (realizado no dia 69) os animais foram anestesiados por via inalatória com Isoflurano (BioChimico Indústria Farmacêutica LTDA, Lote.1.00063.022, Rio de Janeiro), após a confirmação da ausência de reflexos nociceptivos os animais foram rapidamente ajustados à guilhotina e decapitados. O sangue, tecido adiposo, fígado, ovário e encéfalos foram coletados para posteriores análises. Entre cada eutanásia, todos os equipamentos utilizados foram limpos com álcool 70% a fim de eliminar resíduos de sangue.

#### 4.7 Avaliação do ciclo estral e estratificação do ciclo estral

Por se tratar de um trabalho realizado com fêmeas, neste estudo as ratas foram submetidas a avaliação do ciclo estral via coleta de secreção vaginal conforme protocolo já descrito (Heykants & Mahabir, 2015). Nessa análise as células que revestem a vagina das ratas correspondem aos diferentes níveis de hormônios circulantes e, portanto, estão diretamente relacionados ao estado dos órgãos reprodutivos, potencial de ovulação e acasalamento (ref.). A identificação dos diferentes tipos celulares e sua proporção nas amostras coletadas se correlacionam aos quatro períodos hormonais da rata sendo estes: proestro, estro, metaestro e diestro.

Para a determinação do ciclo estral, os animais foram segurados através do dorso e com o auxílio de uma pipeta, foi inserida uma ponteira plástica estéril no orifício vaginal das ratas com 20  $\mu$ L de PBS, onde foi possível a coleta de secreção vaginal. A secreção coletada, foi depositada em uma lâmina de microscopia submetida ao protocolo de coloração via panotipo rápido (*Instant Prov, New Prov* Produtos para laboratório, Lote:1319/ 10287910055,Paraná) de acordo com instruções do fabricante, a fim de facilitar a visualização das células no microscópio em uma objetiva de 40X. Após a identificação e classificação do ciclo estral, as fêmeas foram estratificadas em duas fases de estado hormonal: alto hormônio (ratas que se apresentavam na fase estral proestro ou estro, onde há alto índice circulante de estradiol e progesterona) e baixo hormônio (ratas que se apresentavam na fase estral metaestro ou diestro, onde há baixo índice circulante de estradiol e progesterona).

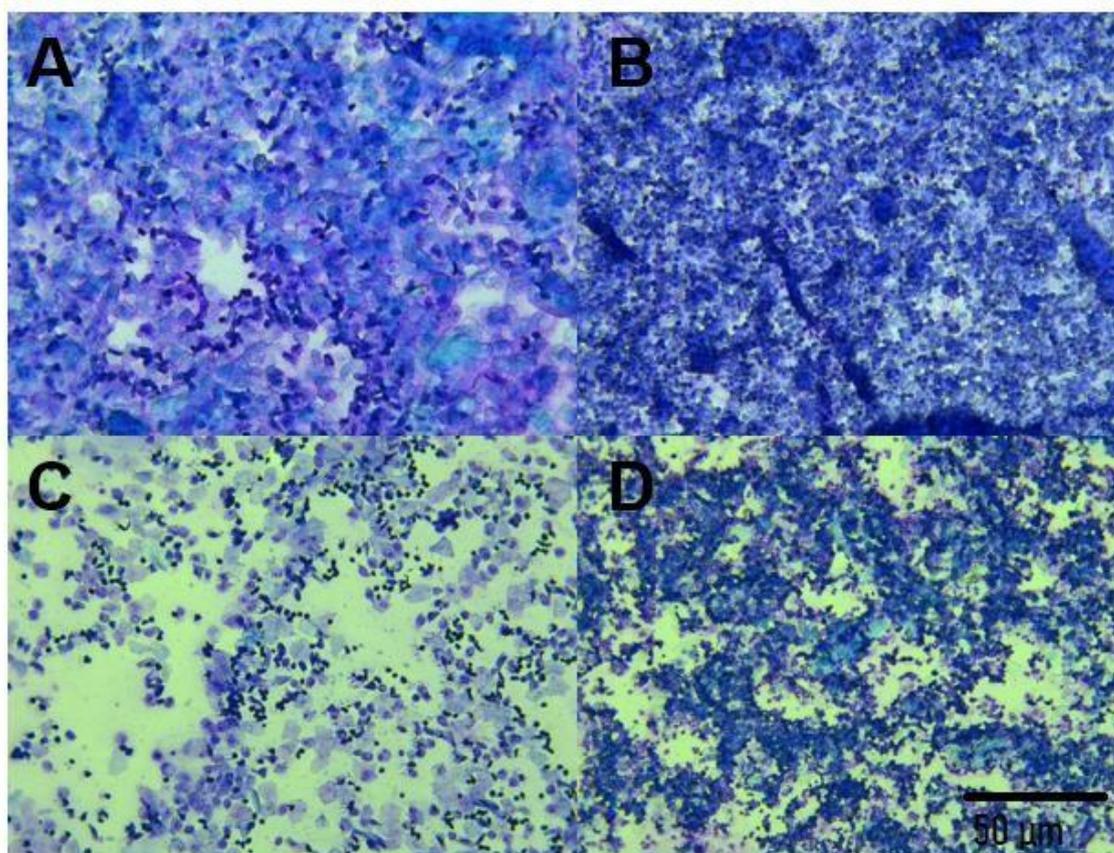


Figura 5: Fotomicrografia das Lâminas referente as fases do ciclo estral dos animais. A) estro, B) proestro, C) diestro, D) metaestro. Lâminas de secreção vaginal, coradas com panótio rápido, avaliadas em microscópio ótico com aumento de 40 X.

#### 4.8 Testes Comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados em uma sala específica, com controle de luminosidade (200 lux), ruído (60db) e temperatura ( $23 \pm 1$  °C). Em relação a alta luminosidade utilizada neste trabalho (200 lux) Phoebe et al., (2014), demonstraram em seu estudo que a intensidade da luz não afeta a capacidade exploratória dos animais testados no LTE. Os animais foram ambientalizados na sala onde foram realizados os testes, 30 min antes do início dos procedimentos. Para realização dos testes comportamentais, os animais foram previamente submetidos ao manuseio pelo experimentador durante 2 dias consecutivos antes da realização dos testes, por 5 minutos, realizando assim o processo de habituação (Figura XX). Todos os aparatos foram limpos com álcool 20% a cada troca de animal, para eliminação de estímulos olfatórios.

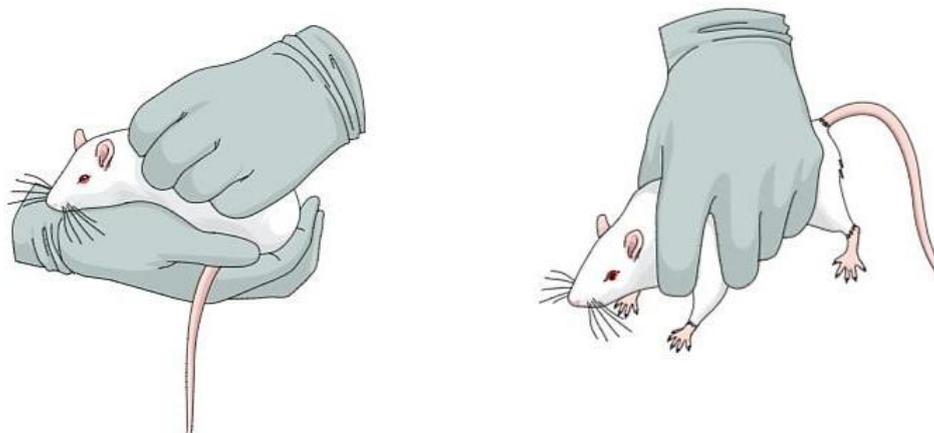


Figura 6: Desenho esquemático do modo de manuseio do animal pelo experimentador durante os testes comportamentais

Fonte: Figura criada utilizando a plataforma *Mind the Graph* ([www.mindthegraph.com](http://www.mindthegraph.com)).

#### 4.8.1 Labirinto em T-elevado (LTE)

Descrito inicialmente por Graeff em 1994, o LTE é composto por três braços de iguais dimensões (50cm de comprimento x 12cm de largura), sendo o braço fechado circundado por paredes de 40 cm de altura e perpendicular à dois braços abertos, estes circundados por uma proteção acrílica de 1 cm de altura nas bordas, para evitar quedas dos animais durante o experimento. Os braços ficam elevados cerca de 50 cm do chão, favorecendo um ambiente aversivo aos animais. O animal quando inserido no braço fechado não observa o braço aberto do aparato, fazendo que o comportamento exploratório seja ativado. No entanto, o braço aberto parece ser uma experiência aversiva aos animais, já que os roedores possuem um medo inato a altura e a ambientes abertos. Deste modo o LTE, busca investigar alterações nos comportamentos defensivos relacionados com a esquiva inibitória (comportamento do tipo ansiedade) e fuga (comportamento do tipo pânico).

A exposição consecutiva, nas esquivas, busca avaliar o comportamento do tipo ansiedade assim como exercer uma função de aprendizado nos animais, uma vez que se espera que o animal aumente seu tempo de latência entre as esquivas, e procure a evitar a inibição se colocado repetidamente dentro do braço fechado. Contralateralmente, quando o animal é colocado no final de um dos braços abertos

ele pode se mover rapidamente em direção ao braço fechado, presumivelmente realizando uma resposta de fuga do ambiente no qual pra ele representa aversividade, caracterizando desde modo a avaliação do comportamento do tipo pânico.

Os animais passaram pelo processo de pré-exposição no aparato no dia anterior ao dia do teste, onde foram expostos ao braço aberto do aparato durante 30 minutos, possuindo livre acesso de exploração ao braço aberto. O teste padrão no LTE foi realizado a partir de três exposições (esquivas) consecutivas ao braço fechado, seguida por três exposições (tentativas) ao braço aberto do aparato, com tempo máximo para cada tentativa de 300s. Cada esquivia/tentativa foi cronometrada e os dados foram tabulados para análises posteriores

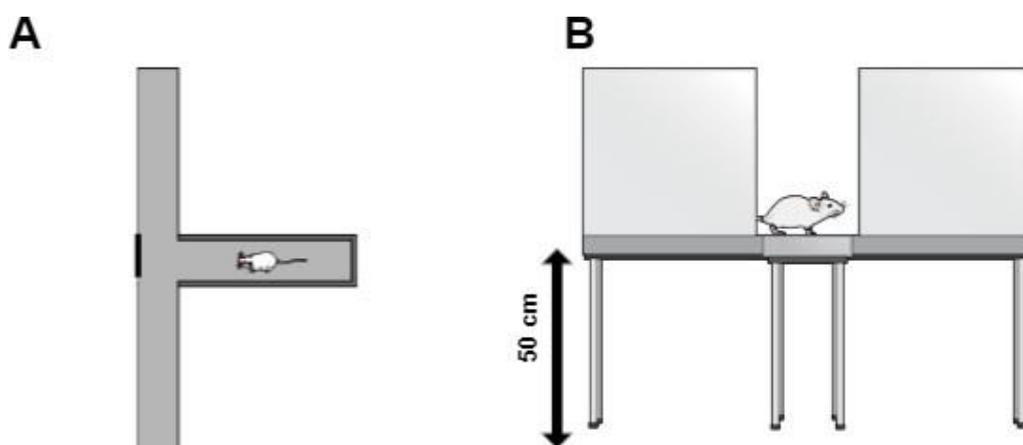


Figura 7: Desenho esquemático do aparato LTE. A) Visão superior do aparato LTE. B) Visão lateral do aparato LTE.

Fonte: Figura criada utilizando a plataforma *Mind the Graph* ([www.mindthegraph.com](http://www.mindthegraph.com)).

#### 4.8.2 Caixa Claro/Escuro

A caixa claro/escuro utilizada nos testes foi feita de acordo como o descrito por Crawley and Goodwin, 1980. O aparato é composto por uma caixa que possui dois compartimentos de acrílico, um feito com material transparente (claro) e outro feito com material preto e opaco (escuro). Os dois compartimentos são conectados por uma pequena abertura de cerca de 10 cm, permitindo que os animais transitem entre ambos os lados.

O teste da caixa claro/escuro baseia-se na investigação do comportamento inato de aversão dos roedores a áreas iluminadas, e na capacidade espontânea de exploração de roedores em resposta a estressores leves (ambiente novo e iluminação). Uma situação natural de conflito ocorre quando o animal é exposto ao ambiente não-familiar ou a novos objetos, tal conflito ocorre principalmente pela tendência natural à exploração dos roedores e à tendência inicial de evitar locais não familiares (neofobia). A atividade exploratória de roedores na caixa claro/escuro reflete um efeito combinado dessas duas tendências, além disso, o aumento nas transições entre ambos os lados e o aumento do tempo de permanência na parte clara do aparato sugere índices de atividade ansiolítica (Bourin and Hascoet, 2003).

Nesse experimento os animais foram inseridos individualmente na CCE, na parte escura da caixa. Após este período, os animais tiveram livre acesso para explorar a caixa por 300 segundos. O tempo que o animal gastou em cada um dos compartimentos foi anotado, assim como o número de vezes que o animal atravessou de um lado para o outro com as quatro patas foi analisado.

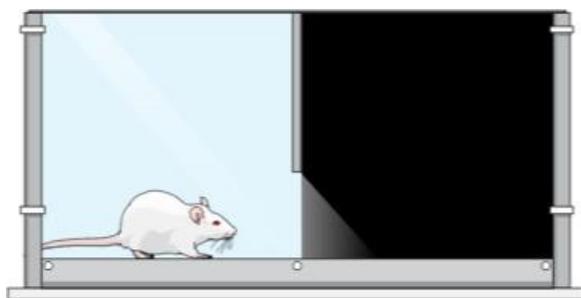


Figura 8: Desenho esquemático do aparato claro escuro.

Fonte: Figura criada utilizando a plataforma *Mind the Graph* ([www.mindthegraph.com](http://www.mindthegraph.com))

### 4.8.3 Campo Aberto

O teste do Campo Aberto foi utilizado para analisar a atividade locomotora dos animais. O aparato se apresenta de maneira geral como uma caixa quadrada (60cm L x 40 cm A x 60 cm P) com paredes e fundo escuros, subdividido em centro e periferia, através de quadrantes. Neste teste o animal foi inserido no centro do aparato com livre exploração e a mensuração de quantos quadrantes foram percorridos em um tempo máximo de 300 segundos.

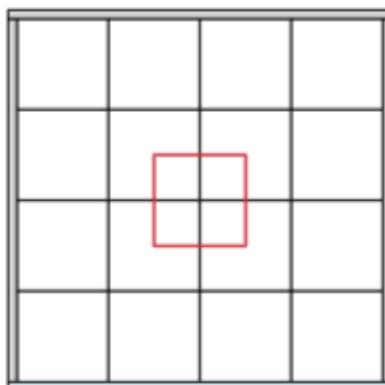


Figura 9: Desenho esquemático do aparato campo aberto.

Fonte: Figura criada utilizando a plataforma *Mind the Graph* ([www.mindthegraph.com](http://www.mindthegraph.com)).

## 4.9 Ensaios Biológicos

### 4.9.1 Análise de íons

Uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de sangue foi coletada diretamente do coração dos animais, e analisada imediatamente no gasômetro (Nova Biomedical, Waltham, Massa, EUA) para a avaliação dos íons metabólicos.

### 4.9.2 Análise do perfil lipídico

A concentração de colesterol total e triglicérides no plasma sanguíneo dos animais foi determinada via método enzimático colorimétrico através do uso de kits comerciais específicos (Bioclin®, Quibasa). Para realização das dosagens, pipetou-se 10  $\mu\text{L}$  de amostra e posteriormente 1mL do reagente disponível no kit em tubos de polipropileno, a seguir as amostras foram colocadas em banho maria em uma temperatura de 37°C por 10 minutos e posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro como um comprimento de onda de 500 nm.

### 4.9.3 Análise do desbalanço redox hepático

#### Proteínas Totais

A análise de proteínas foi realizada no sobrenadante do homogeneizado hepático de acordo com o método de Lowry et al. (1951). O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin Ciocalteu, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azul. Para a realização da dosagem, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de amostra ou padrão em tubos de polipropileno, e completados para 100  $\mu\text{L}$  com água destilada. O branco, usado para zerar o espectrofotômetro, foi feito apenas com 100  $\mu\text{L}$  de água destilada. Posteriormente adicionou-se 1 mL do reagente C em todos os tubos (incluindo branco e padrões). A mistura foi agitada no vórtex e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foi adicionado em cada tubo 100  $\mu\text{L}$  do reagente D. O volume foi misturado e incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 660nm. Após a análise de regressão linear dos pontos com concentração conhecida de albumina, foi determinada a equação da reta e esta foi utilizada para determinar a concentração de proteínas no homogenato hepático.

#### Atividade da Superóxido Dismutase

A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi mensurada no homogeneizado tecidual hepático através do método descrito por Marklund e Marklund (1974). O método se baseia na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do reagente pirogalol. Os reagentes de trabalho utilizados foram: fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Pirogalol e MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H] - 2,5- difenilterazolio) e Dimetilsulfóxido (DMSO). Para a realização da dosagem, fragmentos de 100 mg de tecido hepático foram homogeneizados com 500 $\mu\text{L}$  tampão fosfato (pH 7,0), em seguida, centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi pipetado em placa de 96 poços seguido a adição dos reagentes e suas respectivas concentrações de acordo com protocolo vigente do laboratório.

A placa foi incubada por 5 minutos a 37°C, logo após 150 µL de DMSO foram adicionados para parar a reação. Posteriormente a placa foi lida em espectrofotômetro de placas à 570nm. Após a leitura da placa o valor de absorbância foi convertido em unidade de SOD pela subtração do valor de absorbância da amostra pelo valor do branco, seguido pela divisão desse valor pelo encontrado na subtração do padrão pelo branco. O resultado foi representado em U/mg de proteína.

#### Atividade da Catalase

A atividade de Catalase (CAT) foi mensurada através do método descrito por Aebi (1984) a partir do decréscimo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a uma absorbância de 240 nm. O método é baseado na decomposição enzimática do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em um intervalo de 60 segundos por espectrofotometria. Para a preparação das amostras 100 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10000 x g a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. Inicialmente foram utilizados os seguintes reagentes para o preparo do tampão fosfato: cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), os sais foram diluídos em água destilada e mantidos na geladeira. No momento da análise foi utilizado 25 mL de tampão, que foram misturados com 40 µL de peróxido de hidrogênio. Após o preparo dos reagentes foi iniciada a leitura em espectrofotômetro. O tampão com o peróxido foi aliqotado juntamente com cada amostras em cubeta de quartzo (970 µL e 30 µL, respectivamente) e lidos a 240 nm durante 60 segundos, com registros a cada 10 segundos. A atividade da catalase foi determinada pela diminuição da absorbância a 240nm, de acordo com a Lei de Lambert Beer, onde 1 U equivale a 1µmol de hidrólise de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto, por mL.

#### Análise de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio para a análise de peroxidação lipídica foi realizado através do método descrito por Buege e Aust (1978). Esse método se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) se ligar a lipídeos oxidados. Para a realização da análise, 200 µL do homogeneizado tecidual hepático, adicionado de 300 µL de solução tampão (KPE) foram pipetados em tubo criogênico. Posteriormente 250 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA 28% p/v dissolvido em ácido clorídrico), 250 µL de TBA 1%

dissolvido em ácido acético 1:1 e 125 µL de butil hidróxitolueno (BHT) 5 Mm dissolvido em etanol foram adicionados. Em seguida, o tubo foi levado ao vórtex e colocado em banho-maria a 95°C por 15 minutos. Após serem resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, o material foi centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 535 nm. A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ), seguindo a lei de Lambert Beer.

### Proteína Carbonilada

Para a determinação de proteína carbonilada foi utilizado um protocolo adaptado do método descrito por Reznick e Packer (1994). 500 µL do homogeneizado hepático foi transferido para tubos de polipropileno e adicionados 500 µL de TCA 10%, misturou-se no vórtex e em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi misturado com 500 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e no escuro, por uma hora e a cada 15 minutos eram misturadas no vórtex. Ao final do período foi acrescentado 500 µL de TCA e as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm.

O sobrenadante foi descartado e 1 mL da mistura de etanol/acetato de etila (1:1) foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex e novamente centrifugados, essa etapa da reação foi repetida por duas vezes. Após a segunda lavagem com a solução de etanol/acetato de etila o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de Dodecil sulfato de sódio (SDS) 6% misturou-se no vórtex e centrifugou-se à 10000 rpm por 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro a 370 nm.

## 5. ANALISES ESTATÍSTICAS

Comparações estatísticas e gráficos foram gerados a partir dos pacotes estatísticos GraphPad Prism (versão 6.01, GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA). Para as análises dos dados da confirmação da indução de obesidade, metabólicos, do status redox hepático e das alterações comportamentais testadas na CCE e no CA, análises ANOVA de dois fatores foram realizadas considerando a dieta (DC ou DH) e o tratamento (veículo ou inulina) como variáveis, seguidas de pos teste de Fisher's (LSD). Para as análises dos dados comportamentais no LTE, análises ANOVA de medidas repetidas foram realizadas, considerando as esquivas e as tentativas de cada animal, seguidas de pos teste de Fisher's (LSD). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM, e analisadas por meio de ANOVA dois fatores seguido de pós teste Fisher's LSD, com  $p < 0.05$ .

## 6 RESULTADOS

### 5.1 O consumo de dieta hiperlipídica por nove semanas é eficiente em induzir obesidade em ratas Wistar, e o tratamento dietoterápico com inulina contem a progressão do aumento de massa gorda.

O consumo alimentar dos animais foi medido durante todo protocolo nutricional (9 semanas), do dia 0 ao dia 35, os animais receberam apenas a dieta controle (DC; 11% de gordura) ou dieta hiperlipídica (DH; 45% de gordura). Em relação ao consumo de ração e ao consumo calórico não obtivemos diferença significativas entre os grupos. Após o início do tratamento com inulina (do dia 42 ao dia 63), o teste ANOVA de dois fatores identificou uma diferença significativa entre a dieta [ $F_{(3, 32)} = 35,52$ ;  $p < 0.0001$ ] e os tratamentos (veículo e a inulina) [ $F_{(3, 32)} = 48,62$ ;  $p < 0.0001$ ]. O pós teste de Fisher LSD mostrou que os animais que receberam DH e foram tratados com veículo apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do consumo alimentar de ração e do consumo em kcal em relação aos animais que receberam dieta controle e veículo. O tratamento com inulina aumentou significativamente ( $p < 0.0001$ ) o consumo de ração e consumo em kcal dos animais controle em relação aos demais grupos, contudo o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) se manteve no consumo de kcal apenas nas medidas 49 e 63. A inulina não impactou o consumo alimentar dos animais que receberam DH.

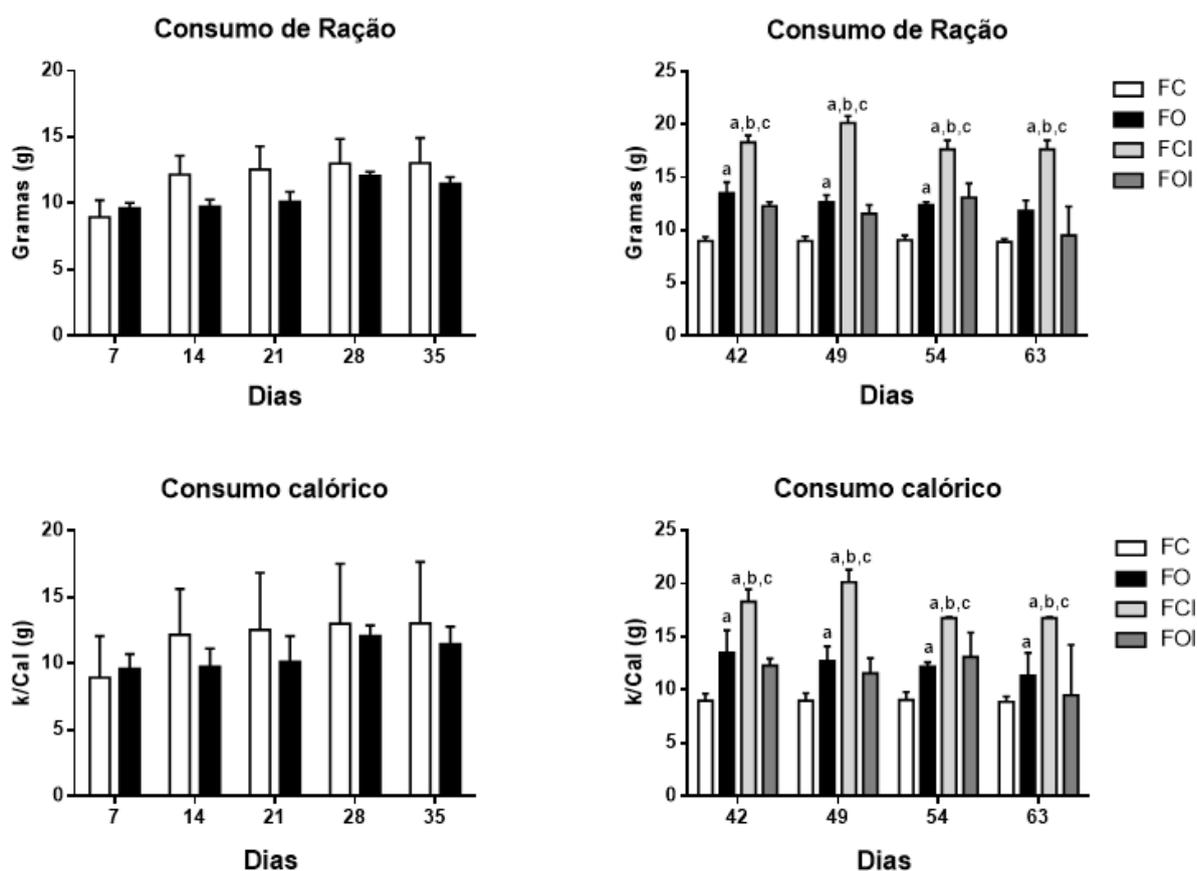


Figura 10: Efeito da DH e do tratamento com inulina sobre o consumo alimentar e calórico por semana nos animais induzidos a obesidade. A) Consumo de ração/semana; fêmea controle (n=24) e fêmea obesa (n=26). B) Consumo de ração/semana; fêmea controle PBS (n=12); fêmea obesa PBS (n=14); fêmea controle inulina (n=12) e fêmea obesa inulina (n=12). a- Diferença estatística entre os tratamentos dietéticos das fêmeas controle (FC) vs. fêmea obesa (FO), c- Diferença estatística entre os grupos tratados com veículo ou inulina; fêmea controle (FC) vs. fêmea controle inulina (FCI) e b- Diferença significativa entre ambos tratamentos e grupos grupos. C) Consumo em kcal/dia, fêmea controle (n=24) e fêmea obesa (n=26). D) Consumo em kcal/dia. Valores expressos em média  $\pm$  EPM, considerando o nível de significância  $p < 0,05$ . Análise feita por ANOVA de dois fatores, seguida por *pós-teste* de Fisher LSD.

Os animais obtidos apresentavam peso inicial similar, e foram distribuídos entre os grupos experimentais de forma randômica. Após o dia 35 os animais foram submetidos ao tratamento com veículo (PBS) ou inulina até o final do protocolo dietético no dia 63. O teste ANOVA de dois fatores mostrou diferença significativa entre a dieta [ $F_{(1, 288)} = 29,50; p < 0.0001$ ], o tempo de protocolo nutricional [ $F_{(5, 288)} = 651,9, p < 0.0001$ ] assim como na interação entre a dieta X o tempo de protocolo nutricional [ $F_{(1, 288)} = 29,50; p < 0.0001$ ]. O *pós teste* de Fisher LSD, evidenciou que os

animais que receberam a DH apresentaram um aumento significativo no ganho de peso ( $p < 0,0001$ ) ponderal do dia 21 ao dia 35 do protocolo nutricional (Figura 11).

Em relação ao ganho de peso a partir do início do tratamento seja este com veículo (PBS) ou inulina, o teste ANOVA de dois fatores demonstrou uma diferença significativa entre a dieta [ $F_{(3, 184)} = 12,65, p < 0.0001$ ] e o tratamento [ $F_{(3, 184)} = 15,16, p < 0.0001$ ]. O pós teste de Fisher mostrou que os animais que receberam DH e veículo (PBS) apresentaram aumento significativo no ganho de peso nas semanas 42,54 e 63 ( $p=0.0428; 0.0119$  e  $0.0310$ ) em relação aos animais que também receberam veículo (PBS) e associado à DC . O tratamento com inulina não impactou o ganho de peso dos animais que receberam DH, contudo os animais que receberam DH e inulina tiveram um aumento significativo do ganho de peso do dia 42 ao dia 54 ( $p=0.0021; 0.0090$  e  $0.0087$ ) quando comparados aos animais que receberam dieta controle e também inulina como tratamento (Figura 11).

Após o protocolo nutricional de nove semanas, o teste ANOVA de dois fatores evidenciou uma diferença significativa no peso final dos animais [ $F_{(1, 46)} = 7,130; p < 0.0104$ ]. O pós teste de Fisher mostrou que os animais que receberam DH/PBS apresentaram um aumento significativo do peso final ( $p= 0.0372$ ) em comparação aos animais que receberam a DC/PBS. No entanto os animais que foram submetidos ao tratamento com inulina a partir do dia 35 do protocolo nutricional não apresentaram diferença significativa em relação ao peso final. Não houve diferença estatística entre os animais que receberam DC/PBS e DC/inulina (Figura 11).

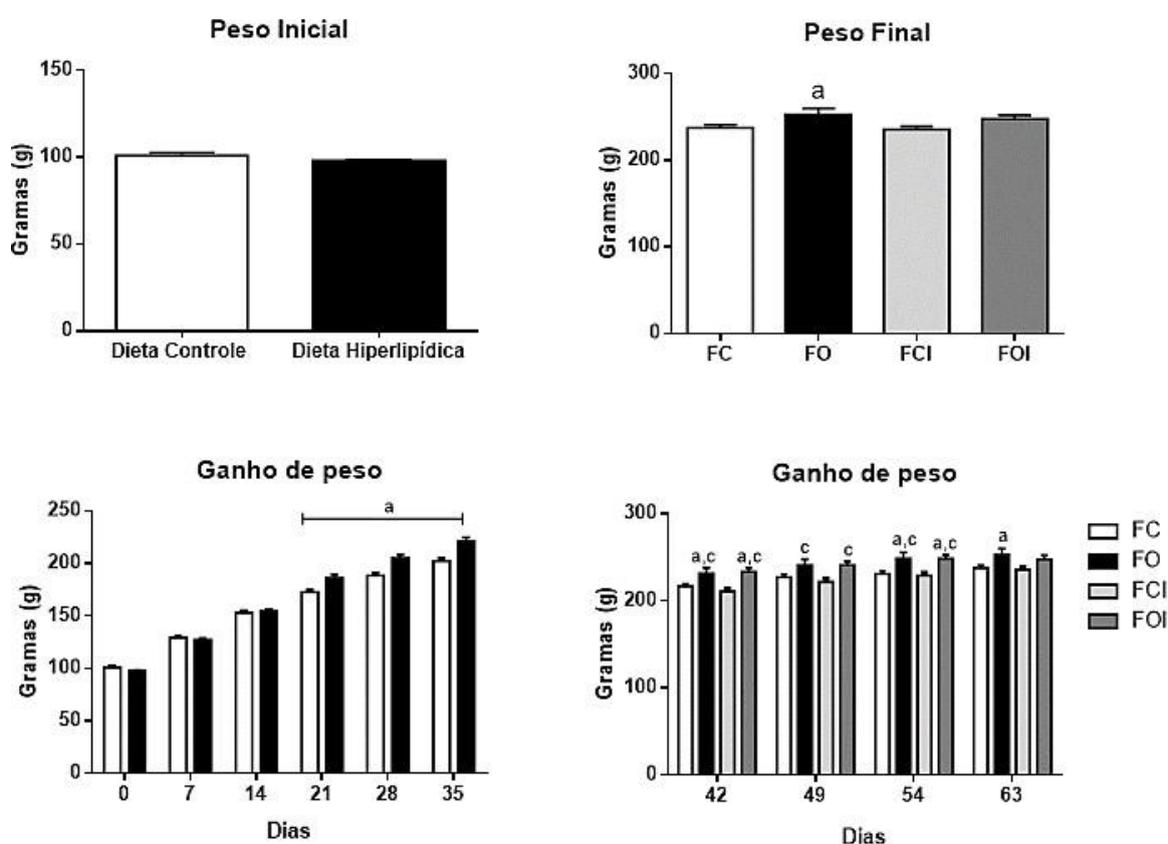


Figura 11: Efeito do consumo de DH/inulina sobre o ganho ponderal e peso final dos animais. A) Peso Final dos animais submetidos ao protocolo nutricional e ao tratamento dietético com inulina. \* Diferença estatística entre os grupos Fêmea Controle PBS (n=12) e Fêmea Obesa PBS (n=14), ANOVA de dois fatores, com pós teste de Fisher LSD B) Ganho de peso dos animais do dia 0 ao dia 35, a- Diferença estatística entre os grupos: Fêmea Controle (n=24) e Fêmea Obesa (n=26). C) Ganho de peso ponderal dos animais após início do tratamento com Veículo (PBS) ou inulina, a- Diferença estatística entre os grupos: Fêmea Controle PBS e Obesa PBS e c- Diferença estatística entre os grupos Fêmea Obesa Inulina e Fêmea Controle Inulina, (ANOVA medidas repetidas, *pós-teste* de Fisher); Fêmea Controle PBS (n=12); Fêmea Obesa PBS (n=14); Fêmea Controle Inulina (n=12) e Fêmea Obesa Inulina (n=12). Valores expressos em média  $\pm$  EPM, considerando o nível de significância  $p < 0,05$ . Análise feita por ANOVA medidas repetidas, seguida por *pós-teste* de Fisher LSD.

Após o fim do protocolo nutricional de 63 dias, os animais que receberam DH e PBS apresentaram um aumento significativo do ganho de peso ( $p=0.009$ ), dos tecidos abdominais brancos [TAB; retroperitoneal, parametrial e inguinal ( $p < 0.0001$ )] e do índice de adiposidade ( $p=0.0013$ ) quando comparados aos animais que receberam dieta controle e PBS. Os animais que receberam DH/inulina apresentaram um decréscimo significativo dos TAB (parametrial  $p= 0.0056$  e inguinal  $p= 0.0005$ ), e do índice de adiposidade ( $p=0.0057$ ) quando comparados aos animais que receberam DH/PBS. O tratamento com inulina também foi capaz de reduzir significativamente o

índice de adiposidade ( $p=0.0111$ ) dos animais que receberam DC quanto comparados aos animais que receberam DC/PBS (Tabela 3).

| Parâmetros              | FC<br>(n=12) | FO<br>(n=14)              | FCI<br>(n=12)            | FOI<br>(n=12)            | ANOVA de<br>dois<br>fatores    |
|-------------------------|--------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Ganho de Peso           | 133 ± 4,23   | 157,9 ± 6,50 <sup>a</sup> | 138,5 ± 3.49             | 147,5 ± 4,51             | [F (1, 46) = 11,36, p=0.0015]  |
| TAB- Retroperitoneal    | 2.64 ± 0,20  | 2.88 ± 0.27 <sup>a</sup>  | 1.43 ± 0,10              | 2.79 ± 0.18              | [F (1, 46) = 51,03, p <0.0001] |
| TAB- Parametrial        | 1,75 ± 0,17  | 5,99 ± 1.05 <sup>a</sup>  | 1.58 ± 0.11              | 3.50 ± 0,29 <sup>b</sup> | [F (1, 46) = 24,98, p <0.0001] |
| TAB- Inguinal           | 0.63 ± 0,06  | 1.53 ± 0.17 <sup>a</sup>  | 0.68 ± 0.05              | 0.89 ± 0.11 <sup>b</sup> | [F (1, 46) = 20,57, p <0.0001] |
| Índice de Adiposidade** | 2,64 ± 0,20  | 3,99 ± 0,43 <sup>a</sup>  | 1,57 ± 0.07 <sup>a</sup> | 2.85 ± 0,20 <sup>b</sup> | F (1, 46) = 21,66, p <0.0001]  |

Tabela 2: Efeito do consumo de DH e do tratamento com inulina sobre os tecidos abdominais brancos dos animais induzidos a obesidade. a- Diferença significativa entre os grupos Fêmea Controle (FC) (n=12) vs. Fêmea Obesa (FO) (n=14), a- Diferença significativa entre os grupos Fêmea Controle (FC) vs. Fêmea Controle Inulina (FCI) (n=12) e b- Diferença significativa entre os grupos Fêmea Obesa (FO) vs. Fêmea Obesa Inulina (FOI) (n=12). Valores expressos em média ± EPM, considerando o nível de significância  $p<0,05$ . Análise feita por ANOVA de dois fatores, seguida por *pós-teste* de Fisher LSD.

\*\* Massa gorda (parametrial + retroperitoneal + inguinal) (g) ÷ peso corporal final (g) x 100

## 5.2 O consumo de dieta hiperlipídica associada ao tratamento dietoterápico com inulina induz alterações metabólicas e lipídicas em ratas induzidas a obesidade

A obesidade em ratas que receberam tratamento com veículo (DH/PBS) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a concentração sanguínea do íon cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), e uma redução também de forma significativa ( $p < 0,05$ ) dos níveis de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}$ ,  $\text{Mg}$  e bilirrubina quando comparadas as ratas controle tratadas com veículo (CD/PBS). O tratamento com inulina em ratas controle foi capaz de aumentar de forma significativa ( $p < 0,05$ ) os valores de  $\text{Ca}^{++}$ , bilirrubina e de reduzir os níveis de  $\text{Na}$ ,  $\text{Cl}$  e quando comparadas as ratas controle que receberam o veículo como tratamento. Em relação as ratas obesas tratadas com inulina, observou-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) de  $\text{Na}^+$  e o aumento dos valores de  $\text{Mg}$  como descrito na tabela 3

| Parâmetros       | FC<br>(n=12)    | FO<br>(n=12)                 | FCI<br>(n=11)                | FOI<br>(n=12)                | Unidade | ANOVA                                    |
|------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------|--|
|                  |                 |                              |                              |                              |         | de dois<br>Fatores                       |
| $\text{Na}^+$    | 147,3 ±<br>0,01 | 137,7 ±<br>0,53 <sup>a</sup> | 138,7 ±<br>0,42 <sup>a</sup> | 132,8 ±<br>0,69 <sup>b</sup> | mmol/l  | [F (1, 43) =<br>148,6,<br>$p < 0.001$ ]  |
| K                | 4,49 ±<br>0,21  | 4,85 ±<br>0,11               | 4,88 ±<br>0,09               | 5,40 ±<br>0,28               | mmol/l  | [F (1, 43) =<br>0,1773,<br>$p = 0.017$ ] |
| Cl               | 109,2 ±<br>0,98 | 106,8 ±<br>0,51 <sup>a</sup> | 106,7 ±<br>0,20 <sup>a</sup> | 107,4 ±<br>0,48              | mmol/l  | [F (1, 41) =<br>5,693,<br>$p = 0.0002$ ] |
| $\text{Ca}^{++}$ | 1,12 ±<br>0,07  | 1,31 ±<br>0,03 <sup>a</sup>  | 1,39 ±<br>0,01 <sup>a</sup>  | 1,35 ±<br>0,01               | mmol/l  | [F (1, 43) =<br>12,85,<br>$p = 0.009$ ]  |
| Mg               | 0,53 ±<br>0,01  | 0,42 ±<br>0,21 <sup>a</sup>  | 0,52 ±<br>0,02               | 0,49 ±<br>0,02 <sup>b</sup>  | mmol/l  | [F (1, 43) =<br>14,25,<br>$p = 0.0005$ ] |
| Bilirrubina      | 10,53 ±<br>0,49 | 4,16 ±<br>0,67 <sup>a</sup>  | 6,74 ±<br>0,65 <sup>a</sup>  | 5,78 ±<br>0,93               | mg/dl   | [F (1, 43) =<br>26,56,<br>$p < 0.0001$ ] |

Tabela 3. Efeito da obesidade e do tratamento com inulina sobre os parâmetros metabólicos de ratas wistar. a- Diferença significativa entre os grupos Fêmea Controle (FC) (n=12) vs. Fêmea Obesa (FO) (n=14), a- Diferença significativa entre os grupos Fêmea Controle (FC) vs. Fêmea Controle Inulina (FCI) (n=12) e b- Diferença significativa entre os grupos Fêmea Obesa (FO) vs. Fêmea Obesa Inulina (FOI) (n=12). Valores expressos em média ± EPM, considerando o nível de significância  $p < 0,05$ . Análise feita por ANOVA de dois fatores, seguida por *pós-teste* de Fisher LSD.  $\text{Na}^+$  (Sódio), K (potássio), Cl (cloreto),  $\text{Ca}^{++}$  (cálcio), Mg (magnésio).

O quadro de obesidade instalado pelo consumo de DH por 63 dias, foi capaz de alterar o perfil lipídico das ratas. O teste ANOVA de dois fatores indicou uma diferença na interação entre dieta X tratamento colesterol total [ $F(1, 39) = 6,410$ ;  $p=0.0155$ ] e no valor de triglicérides entre a dieta [ $F(1, 35) = 17,05$ ,  $p=0.0002$ ], o tratamento [ $F(1, 35) = 9,820$ ;  $p=0.0035$ ] e a interação entre a dieta X tratamento [ $F(1, 35) = 17,23$ ;  $p=0.0002$ ]. O pós teste de Fisher demonstrou que os animais induzidos a obesidade apresentaram uma redução significativa do colesterol total ( $p = 0.043$ ) e do nível de triglicérides ( $p < 0.0001$ ) quando comparados aos animais que receberam DC. O tratamento com inulina não modificou esse parâmetro nas ratas obesas, mas nas ratas controle foi capaz de reduzir os valores de colesterol total ( $p=0.014$ ) e triglicérides ( $p < 0.0001$ ) (Figura 12).

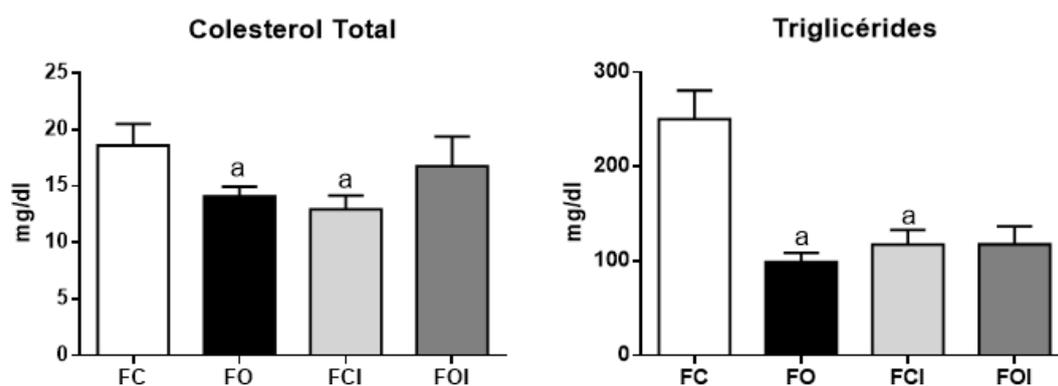


Figura 12: Efeito do consumo de DH isolada e em associação ao tratamento com inulina sobre o perfil lipídico dos animais. A) colesterol total, \*Diferença significativa entre os grupos Fêmea Controle (FC) vs. Fêmea Obesa (FO), # Diferença significativa entre os grupos Fêmea Controle (FC) vs. Fêmea Controle Inulina (FCI). FC n= 11; FO n=12; FCI n=12 e FOI n= 8. B) Triglicérides, \* Diferença significativa entre os grupos Fêmea Controle (FC) vs. Fêmea Obesa (FO), # Diferença significativa entre os grupos Fêmea Controle (FC) vs. Fêmea Controle Inulina (FCI). FC n=8; FO n=13; FCI n=9 e FOI n=9. Valores expressos em média  $\pm$  EPM considerando  $p < 0.05$ . Análise feita por ANOVA de dois fatores, seguida por *pós-teste* de Fisher LSD.

### **5.3 O consumo de dieta hiperlipídica atua sobre os níveis de SOD e de CAT em tecido hepático em ratas induzidas obesidade.**

Após a extração do tecido hepático dos animais, foi realizada a análise bioquímica do sistema antioxidante através da mensuração da atividade das enzimas SOD e CAT. Em relação a CAT, o teste ANOVA de dois fatores demonstrou diferença significativa em relação a dieta [ $F_{(1, 38)} = 64,54$ ,  $p = <0.0001$ ] e ao tratamento [ $F_{(1, 38)} = 10,75$ ,  $p = 0.0022$ ] dos animais estudados. O pós teste de Fisher evidenciou uma redução significativa ( $p = <0.0001$ ) da atividade da CAT nas fêmeas obesas que receberam veículo como tratamento assim como dos animais controle que receberam inulina como tratamento ( $p = 0.0148$ ). O tratamento com inulina nas fêmeas obesas também reduziu de forma significativa ( $p = 0.0449$ ), os níveis da atividade da CAT (Figura 13).

Frente aos parâmetros de dano hepático mensurados (TBARS e Proteína Carbonilada) o teste ANOVA de dois fatores observou apenas uma diferença significativa em relação a dieta [ $F_{(1, 44)} = 4,725$ ,  $p = 0.0352$ ] nos níveis de proteína carbonilada, contudo o pós teste de Fisher não foi capaz de evidenciar diferença significativa nos grupos experimentais. Em relação aos níveis de TBARS não se obteve diferença significativa em nenhuma das variáveis estudadas (Figura 13).

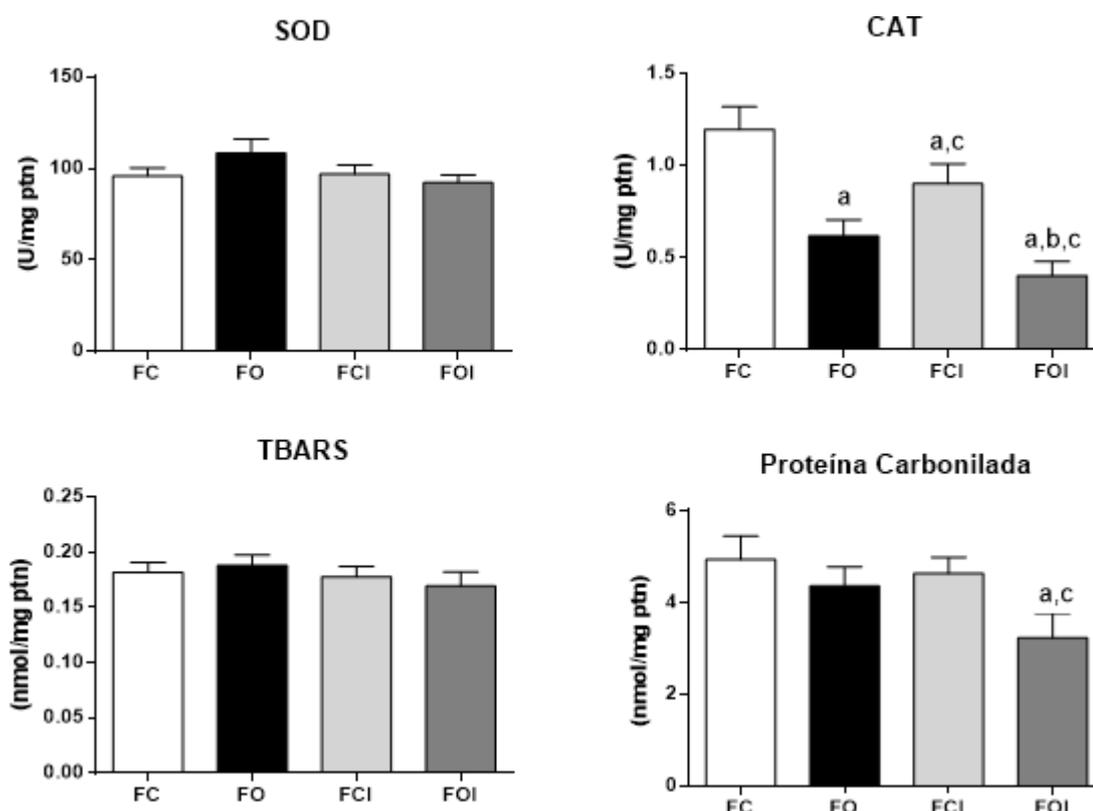


Figura 13: Análise da atividade de enzimas do sistema antioxidante e produtos de peroxidação lipídica e proteica no fígado. A) Análise da atividade da enzima SOD, a- Diferença significativa entre os grupos Fêmea Controle (n=10) vs. Fêmea Obesa (n=11) e b- Diferença significativa entre os grupos Fêmea Obesa (n=11) vs. Fêmea Obesa Inulina (n=12). Fêmea Controle Inulina (n=12). Análise da atividade da enzima CAT, a- Diferença estatística entre os grupo Fêmea Controle (n=10) e Fêmea Obesa (n=10) e entre os grupos Fêmea Obesa e Fêmea Obesa Inulina (n=12). b- Diferença estatística entre os grupos Fêmea Obesa e Fêmea Obesa Inulina (n=12). c) Análise da Proteína Carbonilada. D) Análise da concentração de TBARS. Valores expressos em média  $\pm$  EPM considerando  $p < 0.05$ . Análise feita por ANOVA de dois fatores, seguida por *pós-teste* de Fisher LSD. Abreviações: SOD: Superóxido Dismutase, CAT: Catalase e TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

#### 5.4 Influência da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica e do estado hormonal sobre as respostas defensivas comportamentais do tipo ansiedade e pânico testadas no Labirinto em T elevado

Os animais foram submetidos ao teste comportamental LTE, onde a análise ANOVA de medidas repetidas identificou uma diferença significativa referente as esquivas dentro dos grupos [ $F_{(2, 48)} = 8,641$ ;  $p = 0,0006$ ], indicando uma aprendizagem ao longo das tentativas. O pós teste de Fisher's LSD mostrou uma diferença

significativa no aumento do tempo entre as esquivas dos animais FC, evidenciado entre a LB vs. E2 ( $p=0,0002$ ) e entre a E1 vs. E2 ( $p=0,0025$ ) Não houve diferença entre as esquivas dos animais obesos, o que pode indicar alteração da aprendizagem ao longo das tentativas. Em relação à análises entre os grupos, foi identificado redução significativa do tempo de latência dos animais obesos na E2 quando comparados aos animais E2- FC vs. E2- FO ( $p=0,0429$ ), sugerindo que os animais obesos: 1) não aprenderam a esquivas do braço fechado, e 2) a dieta hiperlipídica em fêmeas induz respostas ansiolíticas. (Figura 14)

Em relação ao comportamento de fuga, o teste ANOVA de medidas repetidas mostrou proximidade da diferença estatística quanto ao tempo de fuga dentro dos grupos [ $F_{(2,48)} = 3,112$   $p = P = 0,0536$ ], contudo o pós teste de Fisher LSD demonstrou uma diferença significativa no aumento do tempo de latência dos animais obesos entre F1 vs. F3 ( $p=0,0368$ ), o que reforça o papel ansiolítico da DH em fêmeas (Figura 14). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre a interação dieta X tentativas.

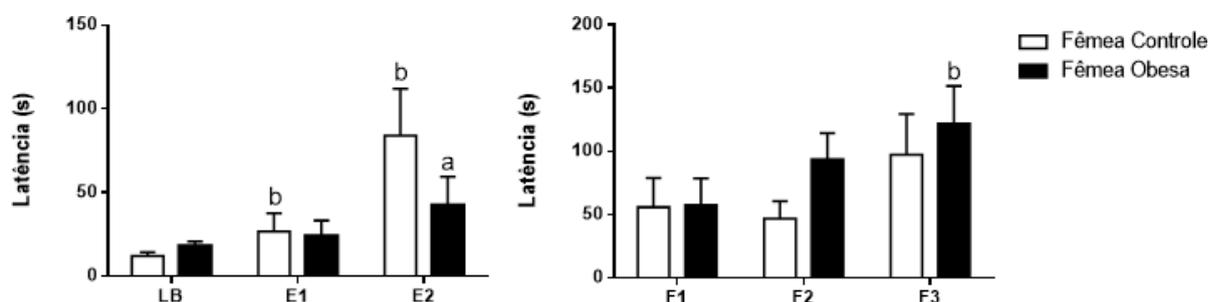


Figura 14: Labirinto em T elevado. A) Tempo gasto pelos animais em sair do braço fechado em três exposições. B) Tempo gasto pelos animais em sair do braço aberto em três tentativas. a-Diferença significativa entre os grupos Fêmea Controle (n=12) (FC) vs. Fêmea Obesa (n=14) (FO), b- Diferença significativa entre as tentativas dentro do próprio grupo. Valores expressos em média  $\pm$  EPM, nível de significância  $p < 0,05$ . Dados analisados via ANOVA medidas repetidas, pós-teste de Fisher. LB (Linha de Base); E1 (Esquiva 1); E2 (Esquiva 2); F1 (Fuga 1); F2 (Fuga 2) e F3 (Fuga 3).

Para investigar o papel dos hormônios sexuais de fêmeas no diferentes comportamentos fisiológicos gerados pelo LTE, realizou-se estratificação dos animais, seguindo os parâmetros de estado hormonal, os resultados referentes aos animais que se encontravam no estado hormonal alto hormônio (que engloba as fases do ciclo estral proestro e estro), não apresentaram nenhuma diferença significativa entre a dieta e o estado hormonal no teste ANOVA de medidas repetidas [ $F_{(2,12)} = 2,119$ ;  $p = 0,1629$ ]. Em relação ao comportamento de fuga também não se identificou

nenhuma diferença significativa referente a dieta e o estado hormonal dos animais no teste ANOVA medidas repetidas (Figura 15).

Já em relação aos resultados referentes aos animais que se encontravam em baixo hormônio (fase do ciclo estral metaestro e diestro) no dia do teste, o teste ANOVA de medidas repetidas demonstrou uma diferença significativa entre as esquivas [ $F_{(2, 32)} = 6,676$ ;  $p=0.0038$ ] dos animais FC- baixo hormônio e FO-baixo hormônio. O pós teste de Fisher mostrou um aumento significativo do tempo de latência dos animais controle entre as esquivas, e o pós teste indicou diferença entre LB vs. E2 ( $p=0.0067$ ) e E1 vs. E2. ( $p=0.0150$ ). Não houve diferença significativa entre as esquivas dos animais FC-BH X FO-BH (Figura 15).

No comportamento de fuga, as fêmeas que se encontravam em baixo hormônio no dia do teste, apresentaram diferença significativa no teste ANOVA medidas repetidas referente as tentativas [ $F_{(2, 32)} = 10,36$ ;  $p=0.0003$ ]. O pós teste de Fisher evidenciou uma diferença significativa entre as tentativas tanto das FC-BH (F1 vs. F3 ( $p=0.0251$ ) e F2 vs. F3 ( $p=0.0454$ )) quanto das FO-BH (F1 vs. F2  $p=0.0155$ ) e F1 vs F3 ( $p=0.0002$ )). Não foram encontradas diferenças significativas em relação a dieta, o estado ou hormonal ou a interação de ambos (Figura 15).

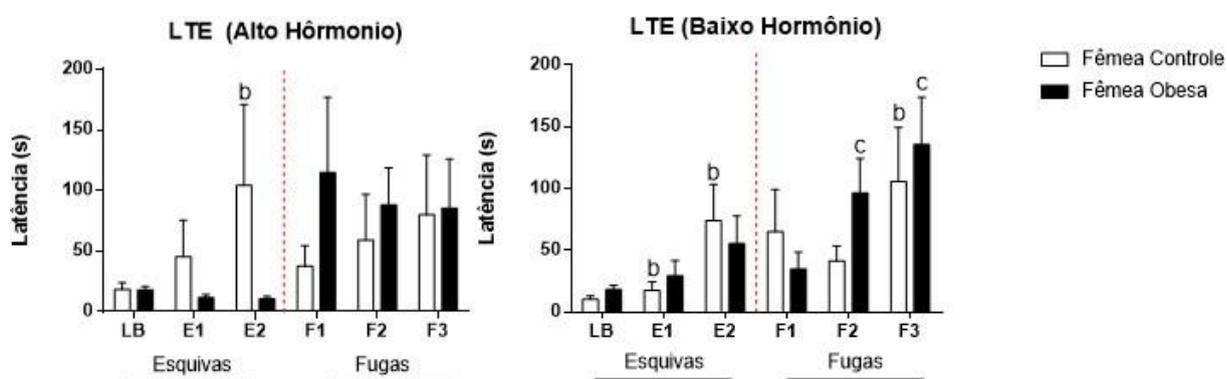
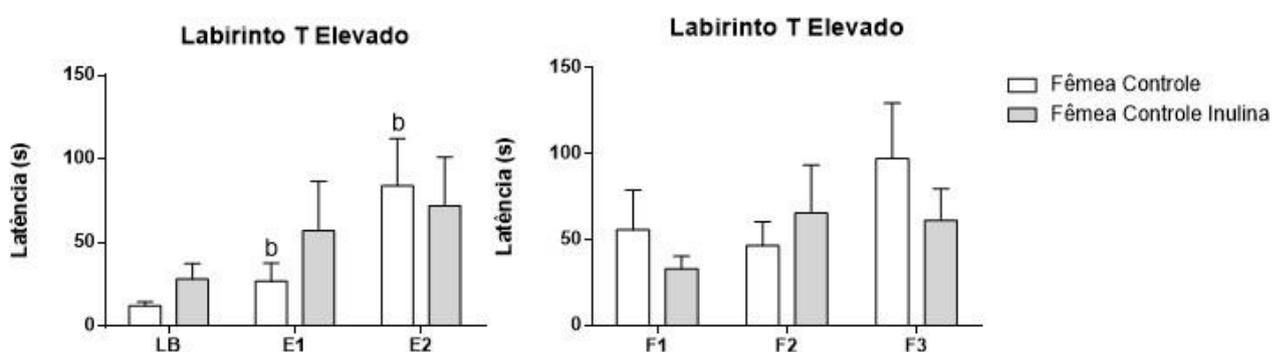


Figura 15: Labirinto em T elevado. A) Tempo gasto pelos animais em sair do braço fechado em três exposições e tempo gasto pelos animais em sair do braço aberto em três tentativas em animais em alto estado hormonal no dia do teste Fêmea Controle- Alto Hormônio ( $n=4$ ) (FC-AH) vs. Fêmea Obesa- Alto Hormônio ( $n=4$ ) (FO-BH), # Diferença significativa entre as tentativas dentro do próprio grupo. B) Tempo gasto pelos animais em sair do braço fechado em três exposições e Tempo gasto pelos animais em sair do braço aberto em três tentativas em animais em Baixo estado hormonal no dia do teste. b e c Diferença significativa entre as tentativas dentro do próprio grupo. Fêmea Controle- Baixo Hormônio ( $n=8$ ) (FC-BH) e Fêmea Obesa-Baixo Hormônio ( $n=10$ ) (FO-BH). Valores expressos em média  $\pm$  EPM, considerando o nível de significância  $p<0,05$ . Análise feita por ANOVA de medidas repetidas, seguida por pós-teste de Fisher LSD. Abreviações: LB (Linha de Base); E1 (Esquiva 1); E2 (Esquiva 2); F1 (Fuga 1); F2 (Fuga 2) e F3 (Fuga 3)

### 5.5 Efeito do tratamento com inulina sobre as respostas defensivas comportamentais do tipo ansiedade e pânico e atividade locomotora de ratas induzidas a obesidade

O tratamento com inulina foi capaz de exercer efeito sobre as respostas defensivas comportamentais dos animais, o teste ANOVA medidas repetidas mostrou uma diferença significativa em relação as esquivas [ $F_{(2, 40)} = 4,723$ ;  $p=0.0144$ ] dos animais controle. Deste modo o pós teste de Fisher evidenciou um aumento da latência entre as tentativas dos animais controle que receberam veículo como tratamento LB vs. E2 ( $p=0.0078$ ) e E1 vs. E2 ( $p=0.03150$ ) (Figura 16). O teste ANOVA de medidas repetidas não mostrou diferença significativa entre o tratamento, ou entre a interação tratamento X esquivas. Em relação ao comportamento de fuga dos animais não foi encontrada nenhuma significância entre as variáveis.

O teste ANOVA de medidas repetidas não foi capaz de evidenciar uma diferença significativa nos animais obesos que receberam tratamento com inulina em relação as esquivas, ao tratamento ou a interação esquivas X tratamento. Já em relação ao comportamento do tipo fuga, o teste de anova medidas repetidas demonstrou uma diferença significativa referentes as tentativas [ $F_{(2, 48)} = 5,812$ ;  $p=0.0055$ ] entre as fêmeas obesas-veículo e obesa-inulina. O pós teste de Fisher mostrou uma diferença significativa no aumento do tempo de latência desses animais entre as tentativas, Fêmea Obesa- FO (F1 vs. F3,  $p=0.0184$ ) e Fêmea Obesa Inulina- FOI (F1 vs. F3,  $p=0.0242$ ) (Figura 16).



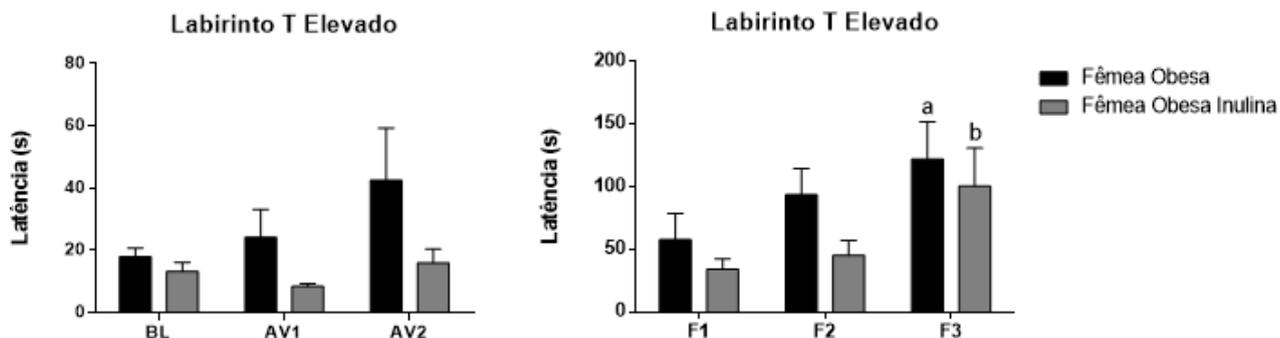


Figura 16: Efeito do tratamento com inulina em ratas induzidas a obesidade. A) Tempo gasto pelos animais em sair do braço fechado em três exposições; B) Tempo gasto pelos animais em sair do braço aberto em três tentativas. Fêmea Controle (n=12) e Fêmea Controle Inulina (n=10). b- Diferença significativa entre as esquivas dentro do próprio grupo. C) Tempo gasto pelos animais em sair do braço fechado em três exposições, c- Diferença significativa entre os grupos Fêmea Obesa (n=14) e Fêmea Obesa Inulina (n=12). B). Tempo gasto pelos animais em sair do braço aberto em três tentativas. Valores expressos em média  $\pm$  EPM \* ou # nível de significância  $p < 0,05$ . Dados analisados via ANOVA de medidas repetidas, pós-teste de Fisher. Abreviações: LB (Linha de Base); E1 (Esquiva 1); E2 (Esquiva 2); F1 (Fuga 1); F2 (Fuga 2) e F3 (Fuga 3).

No aparato da Caixa Claro escuro, o teste ANOVA de dois fatores não mostrou nenhuma diferença significativa entre as variáveis estudadas referente ao tempo de permanência dos animais no compartimento claro, [ $F_{(1, 43)} = 2,307$ ;  $p = 0.1361$ ;  $F_{(1, 43)} = 0,1666$ ;  $p = 0.6851$ ;  $F_{(1, 43)} = 1,690$ ;  $p = 0.2006$ ] Em relação ao número de entradas no compartimento claro pelos animais, o teste ANOVA de dois fatores mostrou uma diferença entre o número de entradas na parte clara referentes a dieta [ $F_{(1, 44)} = 26,10$ ,  $p < 0.0001$ ] e também referente a interação dieta X tratamento [ $F_{(1, 44)} = 12,01$ ,  $p = 0.0012$ ]. O pós teste de Fisher evidenciou um aumento significativo do número de entradas ( $p = 0.0265$ ) das fêmeas controle tratadas com inulina quando comparadas as fêmeas controle tratadas com veículo, já em relação aos animais obesos o pós teste evidenciou uma redução significativa do número de entradas ( $p = 0.0106$ ) das fêmeas obesas tratadas com inulina quando comparadas as fêmeas obesas que receberam veículo como tratamento (Figura 18). Esses dados reforçam a ideia de que o estado hormonal influencia as respostas defensivas comportamentais.

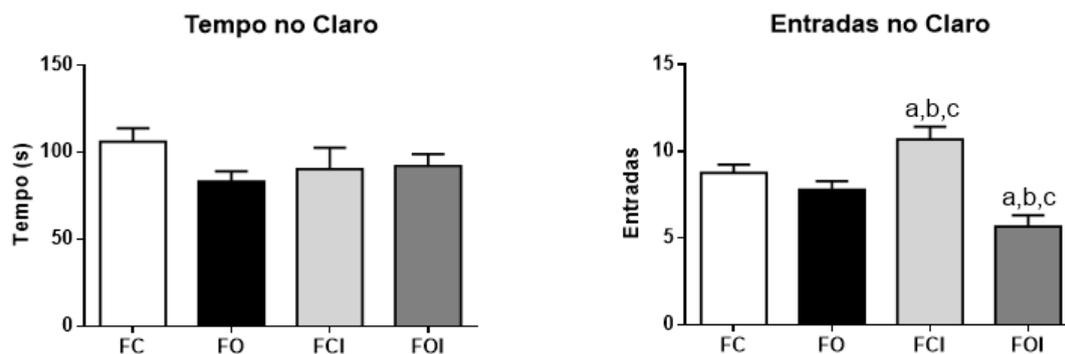


Figura 17: Animais submetidos a Caixa Claro Escuro. A) Tempo de permanência dos animais no compartimento claro. B) Número de entradas dos animais no compartimento claro. a- Diferença estatística entre os grupos Fêmea Controle (n=12) e Fêmea Controle Inulina (n=10); Valores expressos em média ± EPM b-Diferença estatística entre os grupos Fêmea Obesa (n=14) e Fêmea Obesa Inulina (n=12). nível de significância  $p < 0,05$ . Dados analisados via ANOVA de dois fatores, *pós-teste* de Fisher.

Em relação a atividade locomotora dos animais testados no aparato do campo aberto, teste ANOVA de dois fatores mostrou uma diferença significativa na interação dieta X tratamento [ $F(1, 44) = 5,569$ ,  $p = 0,0228$ ] entre o número de quadrantes percorridos e as variáveis estudadas. Os *pós teste* de Fisher evidenciou uma redução significativa ( $p = 0,0103$ ) entre o número de quadrantes percorridos entre as Fêmeas Obesa Inulina quando comparadas as Fêmeas Controle Inulina (Figura 19). Em nosso entendimento, o efeito locomotor reduzido nas fêmeas inulinas tem relação ao menor estresse gerado por um ambiente novo e consequente redução da exploração, e não na capacidade de deambular adequadamente.

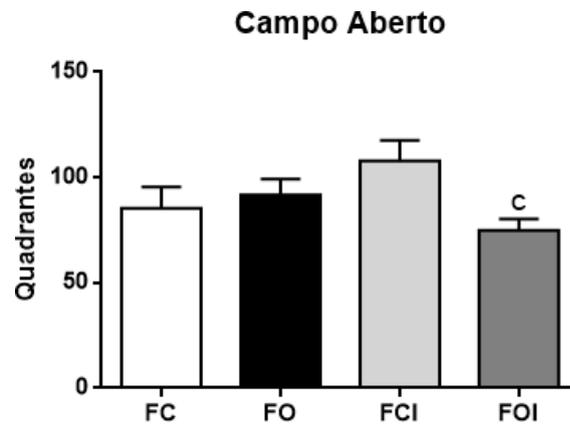


Figura 18: Animais submetidos ao campo aberto. c- Diferença significativa entre os grupos Fêmea Obesa Inulina (n=12) e Fêmea Controle Inulina (n=10). Fêmea Controle (n=12), Fêmea Obesa (n=14). Valores expressos em Média  $\pm$  EPM. \* nível de significância  $p < 0,05$ . Dados analisados via ANOVA de dois fatores, *pós-teste* de Fischer.

## 7 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o consumo de DH (45% gordura) por nove semanas foi capaz de induzir obesidade em ratas Wistar através do aumento do peso final, do ganho de peso ponderal, aumento dos TAB (parametrial, retroperitoneal e inguinal) e do índice de adiposidade. O tratamento com inulina foi capaz de conter o aumento de massa gorda e de reduzir o índice de adiposidade em ambos os grupos. O consumo de DH associado ao tratamento com inulina foi capaz de alterar os parâmetros metabólicos, lipídicos e o desbalanço redox hepático, mas não modificou o ciclo estral das ratas. Constatamos ainda que a obesidade foi capaz de exercer influência sobre as repostas defensivas comportamentais do tipo ansiedade (promovendo um possível efeito ansiolítico, evidenciado pela diminuição do tempo de latência da esQUIVA 2) e pânico (aumentando o tempo de latência entre as tentativas, evidenciando um padrão panicolítico), assim como prejudicar o aprendizado de ratas testadas no LTE. O estado hormonal também foi evidenciado como um modulador das respostas comportamentais, porém o quadro de obesidade não foi capaz de modificar o ciclo estral das ratas, assim como o tratamento dietoterápico com inulina.

Em nosso trabalho, foi realizado um protocolo nutricional previamente padronizado e replicado pelo nosso grupo de pesquisa (Abreu et al., 2014; Noronha et al., 2018; Noronha et al., 2019), contudo esse trabalho se configura como o primeiro do nosso grupo a aplicar o mesmo protocolo já padronizado em machos, em fêmeas. Dados do nosso grupo, evidenciaram que nosso protocolo nutricional (DH- 45% de gordura como fonte principal a banha de porco) de forma crônica (durante 9 semanas) foi eficiente em induzir obesidade em ratos da linhagem Wistar, através do aumento dos tecidos adiposos abdominais assim como do índice de adiposidade. Tais dados foram replicados nas fêmeas, mostrando que este protocolo nutricional apresenta um padrão de replicabilidade independente do gênero dos animais.

Estudos com diferentes protocolos nutricionais mostraram a eficiência do consumo de uma DH em induzir obesidade em ratas. Nossos achados corroboram com os dados da literatura, onde Thomsom et al., 2020 mostrou em seu estudo que o consumo de DH (23%-colesterol) por 5 semanas foi eficiente em induzir obesidade em ratas da linhagem Wistar, em consonância Wang et al., 2019 também demonstrou que o consumo de DH (32%-gema de ovo) por 5 semanas é capaz de aumentar a massa gorda e assim promover a indução de obesidade em ratas. Mostrando mais

proximidade ao nosso protocolo Sivanatham et al., 2015 evidenciou em seu estudo que o consumo prolongado (10 semanas) de DH (60%- banha de porco) é capaz de aumentar o ganho de peso ponderal dos animais a partir da quinta semana de protocolo nutricional, assim como é eficiente na indução de obesidade. Dornelas et al., 2018 e Boldarine et al., 2019 demonstram em seus estudos que o consumo de DH (45%- banha de porco) por 10 semanas foi eficiente na hiperplasia do tecido adiposo e aumento do consumo alimentar em ratas Wistar, do mesmo modo que a eficiência na indução da obesidade também foi comprovada.

O percentual de gordura de uma DH pode variar de 30 a 70%, sendo que dados da literatura demonstram maior eficiência na indução de obesidade em dietas que apresentam um percentual maior que 30% (Hariri, Tibault; 2010). O consumo exacerbado de alimentos com alta densidade calórica e com alto teor de gordura, tem relação direta com a instalação e progressão da obesidade, tanto em humanos, quanto em roedores (George et al., 1990). Estudos populacionais na China, EUA e Canadá mostraram que existe uma correlação direta entre o aumento do consumo de gordura e o aumento da adiposidade (Turkey, Kano, 1992). Já em modelos experimentais diversos estudos demonstram a eficiência de dietas ricas em gorduras na indução da obesidade através do aumento de massa gorda (Arika et al., 2019; Muthu et al., 2019).

Frente ao percentual de gordura presente no nosso protocolo nutricional (45% de gordura), este se equipara ao padrão de dietas humanas americanas e europeias (Lissner et al., 1997). Percentuais de gordura em torno de 40 a 50% de gordura, além de mimetizar padrões alimentares humanos, possuem alta eficiência em induzir obesidade em roedores. Speakman, 2019 relata que formulações com alto teor de gordura (acima de 60%) apresentam uma distorção referente a proporção lipídica nas dietas humanas, do mesmo modo que a utilização dessas dietas em modelos experimentais, não demonstram conteúdo potencialmente relevante para estudos fisiológicos, como aqueles que utilizam percentuais próximos ao de 45%. (Speakman, 2019)

Nosso protocolo dietético se constitui de uma dieta hiperlipídica que possui uma proporção aumentada de gordura saturada, tendo origem de uma fonte animal: a banha de porco, o restante do protocolo se constitui de 20% de proteínas e 35% de carboidratos. A gordura saturada, é descrita na literatura como a fonte de gordura mais nociva ao organismo, tendo alto potencial para o aumento da massa gorda, aumento

do colesterol plasmático e indução da obesidade (Frankenberg et al., 2015). Não se limitando ao fator “ganho de peso”, a obesidade é considerada fator de risco para inúmeras doenças como a diabetes tipo 2 (Saxton et al., 2019; Sarparanta, Garcia-Marcia, 2017), hipertensão (Kotsis,2010), doenças coronarianas (Williams, Greene, Kimbro; 2020), síndrome metabólica (Engin, 2017), transtornos neuropsiquiátricos, incluindo nestes a ansiedade (Gomes et al., 2019) e a depressão (Jantararatnota et al., 2017), alterações na microbiota intestinal (Dao, Clement. 2018) assim como alterações em hormônios sexuais como o estrogênio e a progesterona (Broughton, Moley; 2017; Leduc-Gaudet et al.,2018). Neste sentido, nossos resultados convergem para melhor esclarecer como a obesidade induzida por 9 semanas potencialmente desencadeia alterações importantes ao organismo, como as descritas na síndrome metabólica, onde existe instalação do aumento de massa gorda, alteração do perfil metabólico e lipídico. Salientamos também a importância de se estudar esses parâmetros e alterações, no contexto do dimorfismo sexual, demonstrando achados tanto em machos, quanto em fêmeas.

Buscando conter determinadas consequências deletérias da obesidade, em nosso estudo propusemos utilizar um tratamento dietoterápico com o prebiótico inulina. A inulina se constitui como umas das fibras alimentares mais estudadas da literatura (Fan; Cao; Zhang, 2016). Alguns de seus benefícios já são comprovadamente descritos e elucidados para a saúde humana: como seu papel na redução de peso, papel na redução da glicemia e modulação da microbiota intestinal, redução do tecido adiposo e homeostase do perfil lipídico. (Liu et al., 2017; Hiel et al., 2019; Fan; Cao; Zhang, 2016). Neste estudo o tratamento com inulina foi capaz de reduzir a massa gorda e o índice de adiposidade dos animais, assim como influenciar seu consumo alimentar.

Nossos resultados corroboram Sing et al., 2017 e 2018, que em seus estudos, foi demonstrado que o tratamento com inulina durante o protocolo nutricional com uma DH, era capaz de reduzir o peso e a massa gorda dos animais, assim como atuar sobre os índices plasmáticos de insulina e leptina de ratos obesos. Zou et al., 2018 também demonstrou em seu trabalho, que uma suplementação com inulina foi capaz de reduzir a massa gorda, ganho de peso ponderal, glicemia, atuar sobre a disbiose intestinal, além de atenuar a síndrome metabólica através da redução de mediadores pro inflamatórios em ratos induzidos a obesidade.

Contrariamente do esperado, partindo do ponto que o tratamento com inulina atua sobre a ação dos hormônios relacionados à saciedade, em nosso trabalho o tratamento com inulina aumentou de forma significativa o consumo alimentar dos animais que receberam DC. Guo et al., 2018 demonstrou que o tratamento com inulina provocou o aumento do consumo alimentar de roedores, induzidos ou não a obesidade, sugerindo que esse aumento do consumo alimentar está relacionado com a via de produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como propionato e butirato, esses que atuam na redução do processo inflamatório intestinal ocasionado pela obesidade. Acreditamos que a produção de AGCC também atuou frente ao consumo alimentar dos animais controle, mesmo sem a constatação de um processo inflamatório. Desde modo em nosso modelo de obesidade em fêmeas, o tratamento com inulina demonstrou possuir efetividade frente as alterações decorrentes dessa condição, mostrando que essa fibra também age de forma independente do gênero dos animais.

O quadro de obesidade esta intrinsecamente relacionado a quadros de desordens metabólicas. A expansão do tecido adiposo na obesidade, faz com que esse tecido tenha maior ativação de sua função endócrina e atue na produção exacerbada de substancias bioativas como os hormônios e as citocinas (Umano et al., 2019). A hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, ocasionam a expansão do tecido adiposo, o que leva a um aumento do estresse celular, contribuindo para um quadro de hipóxia desse tecido, promovendo deste modo a inflamação (Baak, Marimaan; 2019). O quadro de inflamação, decorrente da hipóxia tecidual, promove a invasão de células imunes no tecido, o que ativa as vias de sinalização envolvidas na produção de citocinas proinflamatórias como TNF, IL-16 e IL-1 $\beta$ , levando continuamente a um quadro de inflamação crônica, sistêmica e de baixo grau (Umano et al., 2019).

O quadro de inflamação de baixo grau causado pela obesidade é uma das vias mais estudadas para explicar as desordens metabólicas, inerentes ou não ao quadro de síndrome metabólica. Neste trabalho avaliamos alguns íons metabólicos nas ratas induzidas a obesidade. A obesidade em ratas foi capaz de aumentar significativamente os níveis de cálcio, e reduzir os níveis de sódio, cloreto, glicose, magnésio e bilirrubina. O tratamento com inulina também foi capaz de modificar o status biológicos de alguns íons metabólicos como a redução de Na<sup>+</sup> e o níveis plasmáticos de Mg. Contudo, cabe observar que o tratamento com inulina em ratas controle, alterou os níveis de Ca<sup>+</sup>, bilirrubina e glicose mostrando os benefícios desse

composto em indivíduos sem nenhuma patologia de base, uma vez que a inulina aumenta absorção de nutrientes como  $\text{Ca}^{+}$  e  $\text{Mg}$  pelo TGI.

Dados do nosso grupo de pesquisa, demonstraram que ratos submetidos a obesidade induzida pela dieta hiperlipídica (45%), apresentam menor quantidade de água corporal quando comparados a animais controle (Abreu et al., 2016), desde modo acreditamos que esse fator pode ter contribuído para o desequilíbrio eletrolítico do sódio, uma vez que esse íon se caracteriza como uma molécula osmoticamente ativa. Em relação ao nível de glicose reduzido nas ratas obesas, acreditamos que esse possa ser explicado pela composição do nosso protocolo, uma vez que a formulação da nossa dieta possui menor quantidade de carboidrato, quando comparada a dieta controle (DC: 56%; DH: 35%), fazendo com que a nossa dieta não tenha alta eficiência para atuar como uma dieta hiperglicêmica. Contudo nossos achados corroboram com os descritos por Pain et al., 2020 e Silva et al., 2019 onde foi observado níveis de glicemia reduzidos em roedores submetidos a obesidade induzida pela DH.

O total de bilirrubina de ratas induzidas a obesidade também foi avaliado, a bilirrubina se caracterizada como uma molécula resultante da quebra dos glóbulos vermelhos, é metabolizada no fígado e seu excesso é excretado na urina e nas fezes (Hinds, Steck. 2018). A bilirrubina pode ser utilizada como um biomarcador para função hepática, uma vez que o fígado participa do seu metabolismo, conjugação e excreção (Hinds, Steck. 2018). Vários modelos de obesidade induzida pela dieta ocasionam danos hepáticos, neste trabalho encontramos uma redução do nível de bilirrubina em ratas induzidas a obesidade, o que sugere sinais de sobrecarga hepática, podendo evoluir para futuros danos hepáticos. Nosso achado, corrobora o de Thompson et al., 2020 que também demonstrou níveis reduzidos de bilirrubina em ratas submetidas a uma DH.

O perfil lipídico das ratas também foi avaliado, e ratas induzidas a obesidade apresentaram um menor nível de colesterol total quando comparadas as ratas controle. Já o tratamento com inulina, foi capaz de reduzir o colesterol total de ratas controle, porém sem surtir efeito em ratas alimentadas com DH. Na literatura já descritos os efeitos da inulina, sobre a homeostase lipídica, uma vez que sua composição se trata de um carboidrato complexo não dirigível e tem relação com o processo esterificação do colesterol (Reis et al., 2016; Mortensen et al., 2002). Shao et al., 2019 demonstrou que o tratamento com inulina é eficiente em reduzir o colesterol de roedores induzidos ou não a obesidade. Contudo, Mistry et al., 2018

demonstrou que o tratamento com inulina não incidiu alterações nos parâmetros lipídicos de roedores selvagens, já Paim et al., 2020 e Silva et al., 2019 assim como nosso estudo, não encontraram em seus estudos com DH, alterações nos níveis plasmáticos de colesterol. Muniz et al., 2019, demonstrou em seu estudo que uma DH (com gordura saturada/ banha de porco) não foi capaz de alterar o colesterol plasmático dos animais, contudo quando a mesma dieta quando acrescida de 1% de colesterol, foi capaz de induzir um quadro de dislipidemia nos animais, demonstrando alteração em todos os parâmetros lipídicos. Em um estudo com mulheres jovens, foi demonstrado que um consumo de uma dieta rica em gordura e baixa em carboidrato (protocolo semelhante ao desse estudo) não foi capaz de atuar no aumento significativo do perfil lipídico dos indivíduos (Colesterol total, LDL, HDL e TGL), e sim de atuar reduzindo a expressão gênica de genes relacionados ao transporte de colesterol, produção de massa gorda e remodelamento do tecido adiposo. (Retterstol et al., 2018) Em consonância aos nossos resultados, estudos mostram que o consumo de uma DH, é capaz de suprimir os receptores celulares para a fração do colesterol LDL, reduzindo dessa forma sua incorporação a corrente sanguínea e reduzindo o colesterol total a nível plasmático, o que parece ser revertido com a ingestão de fibras alimentares como a aveia e a inulina (Zarate et al., 2016). Nesse contexto, acreditamos que esse mecanismo esteve presente nos animais que receberam DH assim como nos que receberam DH+inulina.

Nossos resultados convergem para o entendimento dos mecanismos relacionados a redução do colesterol plasmático pela ingestão de fibras alimentares. O consumo de fibras, prioritariamente as não digeríveis está relacionado com a redução do colesterol por três mecanismos complementares I) Redução da absorção de colesterol na presença de fibras, uma vez que o consumo de fibras promove a formação da gelificação das paredes intestinais, o que dificultaria a absorção do colesterol ingerido para a corrente sanguínea. II) Aumento da excreção de ácidos biliares, uma vez que a via de produção do colesterol se relaciona com a produção da bile (emulsificante endógeno para as gorduras ingeridas de forma dietética). Ao que tudo indica, o consumo de fibras, impede a reabsorção de ácidos biliares o que consequentemente leva a sua maior excreção. Nesse cenário, com a maior excreção dos ácidos biliares uma maior produção de colesterol hepático é produzida para que haja a formação da bile e não sua destinação a circulação sanguínea. Outra hipótese é a geração de um balanço homeostático entre o colesterol plasmático e o hepático,

onde há uma redução dos níveis de colesterol plasmático em vista da maior produção hepática dessa molécula. III) Influência dos AGCC na síntese do colesterol, via mecanismo de inibição da sua síntese.

Outro parâmetro avaliado em nosso estudo, foi o nível plasmático de triglicérides. O nível de triglicérides foi menor em ratas obesas quando comparadas as ratas controle. Sugerimos, que o resultado desse parâmetro seja reflexo da composição da dieta, uma vez que a baixa porcentagem de carboidratos na DH não tenha eficiência para elevar os níveis plasmáticos de triglicérides, uma vez que essas moléculas são resultantes da quebra de carboidratos, principalmente de carboidratos simples. Nossos achados corroboram com os de Mendez et al., 2020, Paim et al., 2020 e Silva et al., 2019 que também encontram valores de plasmáticos menores em roedores submetidos a DH quando comparados aos que consumiram DC. Já em ratas controle o tratamento com inulina foi capaz de reduzir esse índice, mostrando novamente os benefícios da inulina em indivíduos saudáveis.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) se relaciona com o quadro de inflamação crônica e de baixo de grau observado na obesidade. Acredita-se que as vias intracelulares ativadas para indução de inflamação são adjacentes as vias que ativam a oxidação e o estresse celular, através de mecanismos de oxirredução (Khan, Yasmeen; 2006). Deste modo, o quadro de obesidade se relacionada com a produção exacerbada de EROS, essa que está relacionada com o dano celular e tecidual, ocasionado dessa forma prejuízos aos sistemas biológicos (McMurray et al., 2016). Nesse trabalho avaliamos o impacto da DH no desbalanço redox hepático, os resultados obtidos demonstraram que o sistema antioxidante dos animais submetidos a obesidade apresentou alterações em enzimas com atividades antioxidantes: a SOD e a catalase. Observamos um aumento da atividade de SOD acompanhada da redução da atividade de catalase em ratas submetidas a obesidade.

A SOD é umas das primeiras enzimas antioxidantes ativadas para a remoção de EROS, seguidas das demais enzimas do sistema antioxidante: catalase e glutathione (McMurray et al., 2016). Sugerimos com esse achado, que o quadro de obesidade induziu a formação de EROS, evidenciado pelo aumento da atividade da SOD hepática. Conseqüentemente com o aumento da atividade de SOD, houve um desbalanço no sistema antioxidante evidenciado pela menor atividade da catalase em ratas induzidas a obesidade. Nesse contexto, o consumo de dietas ricas em lipídeos e a instalação de um quadro de obesidade se relacionam com mecanismos de

produção de EROS e alteração do metabolismo do oxigênio através de vias relacionadas a oxidação mitocondrial, peroxidação dos ácidos graxos assim como do consumo excessivo de oxigênio (Khan, Yasmeen; 2006). Nossos resultados corroboram com os de Thompson et al., 2020, e De Souza et al., 2018 que apresentaram em seus trabalhos níveis aumentados de SOD e reduzidos de CAT em fígado, rins e pulmões de roedores submetidos a obesidade induzida pela DH, já Liu et al., 2019, Dharavatha et al., 2019, Echeverría et al., 2018 e Ahmad et al., 2020 demonstraram em seus estudos, que ratos alimentados com uma DH apresentam níveis da atividade da catalase hepática diminuídos quando comparados a animais controle, evidenciando que a porcentagem de gordura impacta a atividade hepática dessa enzima.

Em relação ao tratamento com inulina, este promoveu uma reversão do nível de atividade da enzima SOD e uma diminuição dos níveis de CAT em ratas induzidas a obesidade, já em ratas controle o tratamento foi capaz de incidir alterações apenas nos níveis da atividade da CAT. Kalantari et al., 2019 em seu estudo demonstrou que o tratamento com inulina atua sobre os níveis de atividade de SOD em um modelo de toxicidade hepática, já Corrêa-Ferreira et al., 2017 e Liu et al., 2015 demonstraram em seus trabalhos que o tratamento com inulina reduziu os níveis de SOD e CAT em um modelo de injúria hepática, quando comparados aos animais controle. Esses achados reforçam o efeito protetivo da inulina assim como seu possível fator antioxidante sobre o estresse oxidativo ocasionado pelo aumento de produção de EROS e desbalanço do sistema antioxidante enzimático. Possivelmente a fibra solúvel aumenta os níveis antioxidantes, neutralizando dessa forma as EROS.

O desequilíbrio redox exacerbado associado a produção excessiva de EROS, pode ocasionar danos as células e tecidos do organismo, nesse contexto a obesidade está relacionado a danos proteicos e de peroxidação lipídica em órgãos como os rins, fígado e encéfalo (Ozata et al., 2002). Nesse trabalho avaliamos danos proteicos e de peroxidação lipídica no fígado dos animais estudados, através dos biomarcadores de proteína carbonilada e TBARS. Os resultados obtidos não evidenciaram danos hepáticos ocasionados pela produção das EROS, sugerindo que a obesidade desbalanceia o sistema antioxidante enzimático sem provocar dano hepático. Nossos dados, corroboram com os de Mendez et al., 2020, que em seu estudo com ratos induzidos a obesidade não encontrou diferença estatística nos níveis de proteína carbonilada nem de TBARS.

Partindo do ponto que os quadros de inflamação e desbalanço redox relacionados ao quadro de obesidade conseguem impactar os sistemas biológicos, incluindo os circuitos neurais do SNC e que diferentes substratos neurais são recrutados nos roedores para mediar respostas relacionadas as repostas defensivas comportamentais e a memória processual e espacial, buscamos investigar as repostas defensivas comportamentais dos animais estudados. Nossos achados demonstraram que ratas induzidas a obesidade, apresentaram comprometimento do aprendizado quando submetidas a três esquivas consecutivas no LTE em comparação as ratas controle, sendo esse resultado evidenciado pelo aumento significativo do tempo entre as esquivas das ratas controle. Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa, não demonstraram essa alteração em ratos, demonstrando que o consumo de DH pode impactar de forma diferente o comportamento dos animais, depende do gênero. Sugerimos dessa forma que o aprendizado das ratas obesas foi prejudicado através de mecanismos neurais implícitos ao consumo de DH e instalação de um quadro de obesidade.

Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa, evidenciaram que o protocolo nutricional de 9 semanas com uma DH em ratos machos, além de induzir obesidade foi capaz de alterar as repostas defensivas comportamentais desses animais, facilitando as repostas do tipo ansiedade em animais expostos ao LTE (Noronha et al., 2018). Os resultados do nosso grupo, evidenciaram um aumento do tempo de latência dos animais na esquiva 1 quando comparados aos animais controle. Dados do nosso grupo, reforçam que as repostas defensivas comportamentais estão relacionadas com a desregulação gabaérgica no HDM o que estaria facilitando as repostas do tipo ansiedade em ratos obesos, produzindo dessa forma um possível efeito ansiogênico. Esses achados também foram confirmados com administração de agonistas e antagonistas GABA A, o muscimol e a bicuculina. (Noronha et al., 2018, Noronha et al., 2016). Continuamente com o avanço do estudo do modelo de obesidade induzida pela DH, nosso grupo evidenciou um aumento da neuroinflamação em núcleos encefálicos responsáveis pela mediação das repostas defensivas comportamentais, demonstrando pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-6 no hipotálamo e na amígdala e TNF apenas na amígdala (Noronha et al., 2019).

Neste trabalho realizado com fêmeas, encontramos repostas contrárias às observadas em machos, uma vez que os dados encontrados demonstraram um

possível efeito ansiolítico da DH em ratas obesas expostas ao LTE. Nossos resultados evidenciaram um menor tempo de latência de ratas obesas na esquiva 2 quando comparadas as ratas controle. Outro resultado contrário nas fêmeas em comparação ao observado nos machos, foi o das respostas relacionadas ao comportamento do tipo pânico, uma vez que os ratos obesos não apresentaram nenhuma diferença em relação a essa medida quando expostos a 3 tentativas consecutivas no LTE, enquanto que as fêmeas obesas apresentaram um aumento da latência para realizar o comportamento do tipo fuga quando expostas ao LTE, evidenciado pela diferença estatística entre a F1 e a F3, sugerindo um efeito panicolítico. Nossos achados, convergem para o melhor entendimento de como o consumo de DH e o ambiente obesogênico, podem atuar de maneira diferente em machos e fêmeas, uma vez que diferenças pontuais foram encontradas no mesmo protocolo nutricional e comportamental, aplicado em machos e fêmeas.

Em consonância a esses achados, Weibke et al., 2014 demonstrou que uma dieta de cafeteria foi capaz de promover diferentes respostas comportamentais relacionadas a ansiedade em ratos e ratas da linhagem Wistar. Nesse estudo em questão, o autor observou um aumento do estado ansiolítico em ratas expostas ao labirinto em cruz-elevado (LCE), enquanto que nos machos foi evidenciado uma resposta ansiogênica. Já Sivanatham et al., 2015 mostrou um possível efeito ansiolítico do consumo de DH em ratas quando expostas ao LCE, mas não ao CE e nem no CA, confirmando ainda o papel dos diferentes aparatos para as diferentes formas de avaliação da ansiedade. Dornelas et al., 2018 demonstrou em seu estudo que uma DH (45%) (a mesma utilizada em nosso protocolo nutricional) foi capaz de abolir comportamentos do tipo ansiedade em ratas ovariectomizadas submetidas ao LCE, já Xu et al., 2018 demonstrou que camundongos alimentados com um DH, apresentam estado ansiolítico com 4 semanas de consumo dessa dieta, com o desaparecimento desse efeito ao longo do protocolo nutricional de 12 semanas.

Na literatura já é descrita que a ingestão de alimentos com alto teor de gordura é capaz de influenciar o comportamento (Dallman et al., 2005). O consumo de alimentos palatáveis e com alta densidade calórica é capaz de interferir na produção neuroendócrina de hormônios como a serotonina e a regulação do eixo HPA. Jabem et al., 2019 evidenciou que ratos alimentados com DH apresentaram uma resposta ansiolítica quanto testados ao LCE, esses achados foram acompanhados do aumento de serotonina hipocampal. Dados do nosso grupo de pesquisa ainda não publicados,

demonstram um aumento da expressão gênica de genes serotoninérgicos relacionados a produção e transporte de serotonina central e periférica em ratos induzidos a obesidade pela DH, demonstrando que nosso protocolo nutricional além de induzir a obesidade, é capaz de modular a produção neuroendócrina de hormônios relacionados as respostas comportamentais. A interação entre o consumo de uma dieta rica em gordura pode ser explicada através da modulação do eixo HPA, com alterações que alteram a funcionalidade dos parâmetros endócrinos, entre eles o cortisol nos humanos e a corticosterona nos roedores. Estudos tem demonstrado que dietas altamente calóricas têm um possível efeito protetor contra o estresse, modulando dessa forma a vulnerabilidade a repostas comportamentais. (Buwalda et al., 2001; Pecoraro et al. al., 2004; Dallman et al., 2005). O consumo de gordura saturada é capaz de reduzir sinais de estresse tanto em humanos, quando em modelos experimentais. Prasad 1996, demonstrou em seu estudo que ratos alimentados com DH apresentaram redução da ansiedade quando expostos ao LCE, por possível mediações dos efeitos neuroquímicos e neuroendócrinos da ingestão de gordura, uma vez que esse parâmetro altera inúmeros hormônios entre eles a corticosterona.

Finger et al., 2011 demonstrou que o consumo de uma dieta rica em gordura foi capaz de atenuar quadros de stress crônico em roedores, uma vez que os animais alimentados com uma DH apresentaram resistência a ansiedade induzida por stress, assim como a redução dos níveis de corticosterona. Manian, 2010 demonstrou que animais submetidos ao modelo de separação maternal apresentaram comportamento do tipo ansiedade e depressão, e que o consumo de uma DH atenuou esses índices além de reduzir a expressão genica hipotalâmica do fator de liberação de corticosterona nesses animais. Pecoraro et al., 2004 relata que a ingestão de alimentos ricos em gordura pode proteger contra os efeitos do estresse induzido, uma vez que a DH altera a regulação do eixo HPA, possivelmente suprimindo a liberação de corticosterona. Sugerimos dessa forma, que o eixo HPA dos animais podem ter sofrido alterações via modulação neuroquímica/endócrina ocasionada pelo consumo de DH, reduzindo dessa forma os níveis de produção de corticosterona, o que explicaria o possível efeito ansiolítico encontrado em ratas obesas.

Buscando avaliar os comportamentos fisiológicos gerados nos aparatos comportamentais e por se tratar de um trabalho realizado com fêmeas, buscamos avaliar se o estado hormonal (que corresponde a flutuações dos níveis de estrógeno

e progesterona) teria influência nas respostas defensivas comportamentais. Nossos dados evidenciaram que ratas obesas em alto estado hormonal (ou seja, alto nível de estrógeno), tendem a se manter em um estado ansiolítico quando comparadas as ratas controle também em alto estado hormonal, contudo demonstramos esse achado com um  $n$  abaixo do poder requerido para análises comportamentais. Já em relação as ratas em baixo estado hormonal, nossas análises demonstraram que não há diferenciação entre as ratas obesas e controle no que diz respeito as respostas defensivas comportamentais relacionadas a ansiedade. Já no que tange as respostas comportamentais relacionadas ao comportamento do tipo pânico, tanto ratas controle quanto ratas obesas (com baixo estado hormonal) apresentaram maior tempo de latência entre as tentativas.

Frente ao tratamento com inulina esse não exerceu impacto quando, comparamos ratas controle e obesas que receberam esse tratamento. Ao nosso ver o tratamento com inulina não foi capaz de modular as respostas defensivas comportamentais relacionadas a ansiedade. Barrera-Bugueno et al., 2017 e Morshedi et al., 2020 avaliaram em seus trabalhos a influência do tratamento com inulina sobre alterações comportamentais, e constataram que o tratamento com essa fibra atua sobre os níveis de serotonina, cortisol e BDNF podendo assim modular respostas comportamentais relacionadas a memória e ao estresse, ponto que não foi visualizado no nosso trabalho com a dose e posologia administrada.

O estado hormonal já é descrito na literatura como um modulador das respostas comportamentais. Flutuações hormonais tanto do ciclo menstrual nas mulheres, quando do ciclo estral das ratas podem estar relacionadas com os transtornos psiquiátricos incluindo nestes a ansiedade, a depressão e os déficits cognitivos. Jaric et al., 2019 evidenciou diferenças entre machos e fêmeas testados no LCE, contudo não observou nenhuma diferença em relação as ratas em alto ou baixo nível de estradiol circulante. Ou et al., 2019 demonstrou em seu estudo diferenças no comportamento do tipo ansiedade em ratos e ratas expostos ao LCE, os resultados evidenciaram o maior numero de entradas e permanência no braço aberto do aparato das fêmeas quando comparados aos machos. Já Scholl et al., demonstrou que ratas independentes da fase estrogênica que se encontram (alta ou baixa) apresentam maior tempo de permanência e maior número de entradas no braço aberto do aparato LCE quando comparadas aos ratos.

Pentkowski et al., 2018 demonstrou em seu trabalho que ratas em diferentes fases do ciclo estral apresentaram diferentes comportamentos defensivos incondicionados quando expostas a odor de gato, mostrando que as flutuações em hormônios ovarianos podem modular mediações nas respostas de medo e ansiedade. Yoest et al., 2019 mostrou em seu estudo que liberação de hormônios ovarianos ao longo do ciclo estral modula a adaptação comportamental de ratas a estímulos sexuais e apetitivos já Eglan et al., 2019 demonstrou que ratas que recebem alimentos palatáveis apresentam diferentes respostas de vulnerabilidade ao estresse neuroendócrino de maneira dependente do ciclo estral. Hohos et al., 2018 evidenciou que camundongos alimentados com DH apresentam redução de níveis circulantes de TSH, assim como irregularidade presentes no seu ciclo estral e alteração da expressão gênica de genes relacionados a função ovariana. Esses achados confirmam que o estado hormonal pode atuar frente a respostas defensivas comportamentais, desde modo sugerimos que o estado hormonal associado a instalação do quadro de obesidade exerceu modulações nas respostas defensivas do tipo ansiedade e pânico.

## 8 CONCLUSÃO

Esses resultados indicam que o consumo de uma DH (45%) por 9 semanas foi eficiente em induzir obesidade em ratas, promover um estado ansiolítico, assim como modular as respostas do tipo pânico via estado hormonal/dependente. O tratamento dietoterápico com a inulina na dosagem utilizada não exerceu mudanças sobre o comportamento dos animais.

## 9 REFERÊNCIAS

ABREU, A.R., de Abreu, A.R., Santos, L.T., de Souza, A.A., da Silva, L.G.J., Chianca Jr., D.A., et al., 2014. Blunted GABA-mediated inhibition within the dorsomedial hypothalamus potentiates the cardiovascular response to emotional stress in rats fed a high-fat diet. **Neuroscience** 14 (262), 21–30.

AHMAD, Muhammad Ijaz et al. High fat diet incorporated with meat proteins changes biomarkers of lipid metabolism, antioxidant activities, and serum metabolomic profile in Glrx1-/-mice. **Food & Function**, 2020.

APOSTOLOPOULOS, V., de Courten, M. P., Stojanovska, L., Blatch, G. L., Tangalakis, K., & de Courten, B. (2016). The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. **Molecular nutrition & food research**, 60(1), 43-57.

ARIKA, Wycliffe Makori et al. Effects of DCM Leaf Extract of *Gnidia glauca* (Fresen) on Locomotor Activity, Anxiety, and Exploration-Like Behaviors in High-Fat Diet-Induced Obese Rats. **Behavioural Neurology**, v. 2019, 2019.

ASGHAR, Ambreen; SHEIKH, Nadeem. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. **Cellular immunology**, v. 315, p. 18-26, 2017.

BEN SALEM, Maryem et al. LC-MS/MS analysis and hepatoprotective activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves extract against high fat diet-induced obesity in rats. **BioMed research international**, v. 2019, 2019.

BESSESEN, Daniel H.; VAN GAAL, Luc F. Progress and challenges in anti-obesity pharmacotherapy. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 6, n. 3, p. 237-248, 2018.7

BLÜHER, Matthias. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288, 2019.

BOLDARINE, Valter T. et al. High-fat diet intake induces depressive-like behavior in ovariectomized rats. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

BOURIN M, HASCOËT M. 2003. The mouse light/dark box test. **Eur J Pharmacol** 463: 55–65.

BOURIN, M. (2018). The Use of Animal Models in Defining Antidepressant. **Understanding Depression: Volume 1. Biomedical and Neurobiological Background**, 233.

BRIMELOW, R. E., West, N. P., Williams, L. T., Cripps, A. W., & Cox, A. J. (2017). A role for whey-derived lactoferrin and immunoglobulins in the attenuation of obesity-related inflammation and disease. **Critical reviews in food science and nutrition**, 57(8), 1593-1602.

BROUGHTON, Darcy E.; MOLEY, Kelle H. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. **Fertility and sterility**, v. 107, n. 4, p. 840-847, 2017.

CAMPOS, G. V., de Noronha, S. R., de Souza, A. A., Lima, P. M., Abreu, A. R., Chianca-Jr, D., & de Menezes, R. C. (2019). Estrogen receptor  $\beta$  activation within dorsal raphe nucleus reverses anxiety-like behavior induced by food restriction in female rats. **Behavioural brain research**, 357, 57-64.

CAPURON, L., Miller, A.H., 2011. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. **Pharmacol. Ther.** 130 (2), 226–238

CAPURON, L., Poitou, C., Machaux-Tholliez, D., Frochot, V., Bouillot, J.L., Basdevant, A., Laye, S., Clement, K., 2010. Relationship between adiposity, emotional status and eating behaviour in obese women: role of inflammation. **Psychol. Med.**, 1– 12.

CAPURON, L., Su, S., Miller, A.H., Bremner, J.D., Goldberg, J., Vogt, G.J., Maisano, C., Jones, L., Murrah, N.V., Vaccarino, V., 2008. Depressive symptoms and metabolic syndrome: is inflammation the underlying link? **Biol. Psychiatry** 64 (10), 896 900.

CASTANON, Nathalie; LUHESHI, Giamal; LAYÉ, Sophie. Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 229, 2015.

CASTRO, A. M.; MACEDO-DE LA CONCHA, L. E.; PANTOJA-MELÉNDEZ, C. A. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 80, n. 2, p. 101-105, 2017.

CORDNER, Zachary A.; TAMASHIRO, Kellie LK. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. **Physiology & behavior**, v. 152, p. 363-371, 2015.

CORDNER, Zachary A.; TAMASHIRO, Kellie LK. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. **Physiology & behavior**, v. 152, p. 363-371, 2015.

CORRÊA-FERREIRA, Marília Locatelli et al. Inulin-type fructan and infusion of *Artemisia vulgaris* protect the liver against carbon tetrachloride-induced liver injury. **Phytomedicine**, v. 24, p. 68-76, 2017.

DA SILVA, Bárbara Pereira et al. Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) on oxidative stress and inflammation in ovariectomized adult female Wistar rats. **Food & Function**, v. 10, n. 7, p. 4036-4045, 2019.

DAO, Maria Carlota; CLÉMENT, Karine. Gut microbiota and obesity: Concepts relevant to clinical care. **European journal of internal medicine**, v. 48, p. 18-24, 2018.

DE NORONHA, Sylvana Rendeiro et al. High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. **Behavioural brain research**, v. 316, p. 38-46, 2017.

DO NASCIMENTO, Ezequiel Batista et al. Memory impairment induced by different types of prolonged stress is dependent on the phase of the estrous cycle in female rats. **Hormones and behavior**, v. 115, p. 104563, 2019.

DONNER, Nina C.; LOWRY, Christopher A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 465, n. 5, p. 601-626, 2013.

DORNELLAS, Ana PS et al. Corrigendum: High-Fat Feeding Improves Anxiety-Type Behavior Induced by Ovariectomy in Rats. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, p. 738, 2018.

DOS REIS, Sandra Aparecida et al. Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile. **Nutricion hospitalaria**, v. 31, n. 2, p. 528-534, 2015.

ECHEVERRÍA, Francisca et al. Attenuation of high-fat diet-induced rat liver oxidative stress and steatosis by combined hydroxytyrosol-(HT-) eicosapentaenoic acid supplementation mainly relies on HT. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

EGAN, Ann E. et al. Palatable food reduces anxiety-like behaviors and HPA axis responses to stress in female rats in an estrous-cycle specific manner. **Hormones and behavior**, v. 115, p. 104557, 2019.

ENGİN, Atila. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. In: **Obesity and Lipotoxicity**. Springer, Cham, 2017. p. 1-17.

FAN, C. H.; CAO, J. H.; ZHANG, F. C. The prebiotic inulin as a functional food-a review. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci**, v. 20, n. 15, p. 3262-3265, 2016.

FINGER, B. C.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. High-fat diet selectively protects against the effects of chronic social stress in the mouse. **Neuroscience**, v. 192, p. 351-360, 2011.

FREEMAN, Linnea R. et al. Damaging effects of a high-fat diet to the brain and cognition: a review of proposed mechanisms. **Nutritional neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 241-251, 2014.

GALMÉS, Sebastià et al. A genetic score of predisposition to low-grade inflammation associated with obesity may contribute to discern population at risk for metabolic syndrome. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 298, 2019.

GASCHLER, Michael M.; STOCKWELL, Brent R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017.

GEORGE V, TREMBLAY A, DESPRES JP, et al. (1990) Effect of dietary fat content on total and regional adiposity in men and women. *Int J Obes* 14, 1085–1094.

GEORGE, V. et al. Effect of dietary fat content on total and regional adiposity in men and women. **International journal of obesity**, v. 14, n. 12, p. 1085-1094, 1990.

GOLDSAMMLER, M., Merhi, Z., & Buyuk, E. (2018). Role of hormonal and inflammatory alterations in obesity-related reproductive dysfunction at the level of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 16(1), 45.

GOMES, Julia AS et al. High-refined carbohydrate diet consumption induces neuroinflammation and anxiety-like behavior in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, p. 108317, 2019.

GUILLEMOT-LEGRIS, Owein; MUCCIOLI, Giulio G. Obesity-induced neuroinflammation: beyond the hypothalamus. **Trends in Neurosciences**, v. 40, n. 4, p. 237-253, 2017.

GUPTA, Nitin et al. Inulin: A novel and stretchy polysaccharide tool for biomedical and nutritional applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 132, p. 852-863, 2019.

GUO, Xiulan et al. Rutin and its combination with inulin attenuate gut dysbiosis, the inflammatory status and endoplasmic reticulum stress in Paneth cells of obese mice induced by high-fat diet. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2651, 2018.

HALEEM, Darakhshan Jabeen; MAHMOOD, Khalid. Brain serotonin in high-fat diet-induced weight gain, anxiety and spatial memory in rats. **Nutritional neuroscience**, p. 1-10, 2019.

HARIRI, Niloofar; THIBAUT, Louise. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition research reviews**, v. 23, n. 2, p. 270-299, 2010.

HIEL, Sophie et al. Effects of a diet based on inulin-rich vegetables on gut health and nutritional behavior in healthy humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 109, n. 6, p. 1683-1695, 2019.

HOLMBERG, E. et al. Allopregnanolone involvement in feeding regulation, overeating and obesity. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 48, p. 70-77, 2018.

HORST JP, de Kloet ER, Schächinger H, Oitzl MS. (2012) Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition. **Cell Mol Neurobiol.** 32(5):725-35.

HOHOS, Natalie M. et al. High-fat diet exposure, regardless of induction of obesity, is associated with altered expression of genes critical to normal ovulatory function. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 470, p. 199-207, 2018.

HUANG, Wen-Ching et al. Inulin and fibersol-2 combined have hypolipidemic effects on high cholesterol diet-induced hyperlipidemia in hamsters. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 313, 2016.

JARIC, Ivana et al. Sex and estrous cycle effects on anxiety-and depression-related phenotypes in a two-hit developmental stress model. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 12, p. 74, 2019.

JAACKS, Lindsay M. et al. The obesity transition: stages of the global epidemic. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, 2019.

JANTARATNOTAI, Nattinee et al. The interface of depression and obesity. **Obesity research & clinical practice**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2017.

JAYNE, Julianna M. et al. Body weight status, perceived stress, and emotional eating among.

KALANTARI, Heibatullah et al. Protective effect of inulin on methotrexate-induced liver toxicity in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 943-950, 2019.

KELISHADI, Roya et al. Association of childhood obesity and the immune system: a systematic review of reviews. **Childhood Obesity**, v. 13, n. 4, p. 332-346, 2017.

KHAN NI, Naz L, YASMEEN G. Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. **Pak J Pharm Sci**. 2006;19(1):62-5.

KHAN, Abdul Rehman; AWAN, Fazli Rabbi. Leptin resistance: a possible interface between obesity and pulmonary-related disorders. **International journal of endocrinology and metabolism**, v. 14, n. 1, 2016.

KOTSIS, Vasilios et al. Mechanisms of obesity-induced hypertension. **Hypertension research**, v. 33, n. 5, p. 386-393, 2010.

KROLICK, Kristen N.; ZHU, Qi; SHI, Haifei. Effects of estrogens on central nervous system neurotransmission: Implications for sex differences in mental disorders. In: **Progress in molecular biology and translational science**. Academic Press, 2018. p. 105-171.

LASKER, Shoumen et al. High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.

LEDUC-GAUDET, Jean-Philippe et al. The impact of a short-term high-fat diet on mitochondrial respiration, reactive oxygen species production, and dynamics in oxidative and glycolytic skeletal muscles of young rats. **Physiological reports**, v. 6, n. 4, p. e13548, 2018.

LEENERS, B., Geary, N., Tobler, P. N., & Asarian, L. (2017). Ovarian hormones and obesity. **Human reproduction update**, 23(3), 300-321.

LI, Longman; YANG, Xiaobo. The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: links and interactions. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

LISSNER L, LEVITSKY DA, STRUPP BJ, et al. (1987) Dietary fat and the regulation of energy intake in human subjects. **Am J Clin Nutr** 46, 886–892.

LIU, Dandan et al. Protective effects of mung bean (*Vigna radiata* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) against high-fat-induced oxidative stress. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 12, p. 4063-4075, 2019.

LIU, F. et al. Effect of inulin-type fructans on blood lipid profile and glucose level: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **European journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 1, p. 9-20, 2017.

LIU, Jun et al. Antioxidant and protective effect of inulin and catechin grafted inulin against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 1479-1484, 2015.

LOFFREDA, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengman, M. L., Wang, D. J., ... & Lane, M. D. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. **The FASEB journal**, 12(1), 57-65.

MANIAM, J., & Morris, M. J. (2010). Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. **Behavioural brain research**, 208(1), 72-79.

MARQUES AA, Bevilaqua MC, da Fonseca AM, Nardi AE, Thuret S, Dias GP. (2016) Gender Differences in the Neurobiology of Anxiety: Focus on Adult Hippocampal Neurogenesis. **Neural Plast.** 2016:5026713.

Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, et al. Increased oxidative stress

MELDRUM, David R.; MORRIS, Marge A.; GAMBONE, Joseph C. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions—but do we have the will?. **Fertility and sterility**, v. 107, n. 4, p. 833-839, 2017.

MÉNDEZ, Lucía et al. Modulation of the Liver Protein Carbonylome by the Combined Effect of Marine Omega-3 PUFAs and Grape Polyphenols Supplementation in Rats Fed an Obesogenic High Fat and High Sucrose Diet. **Marine Drugs**, v. 18, n. 1, p. 34, 2020.

MENSINK, Maarten A. et al. Inulin, a flexible oligosaccharide. II: Review of its pharmaceutical applications. **Carbohydrate polymers**, v. 134, p. 418-428, 2015.

Metabolism 2008;57:1071-1077.

MILLA, C., Eveling, Y., Maximiliano, H., and Rosa, C. (2017). Efecto del consumo de inulina de achicoria (*Cichorium intybus*) sobre los niveles de glucosa y malonaldehído (MDA) en suero de ratas inducidas a Diabetes Mellitus Tipo II con estreptozotocina. **Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Peruana Unión**

MISTRY, Rima H. et al. Effect of the prebiotic fiber inulin on cholesterol metabolism in wildtype mice. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

MOLTENI, RAFFAELLA et al. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. **Neuroscience**, v. 112, n. 4, p. 803-814, 2002.

MORSHEDI, Mohammad; SAGHAFI-ASL, Maryam; HOSSEINIFARD, Elaheh-Sadat. The potential therapeutic effects of the gut microbiome manipulation by synbiotic containing-Lactobacillus plantarum on neuropsychological performance of diabetic rats. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2020.

MURPHY MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J** 2009; 417:1-13.

MUTHU, P. Rajaa et al. Amla (*Emblica officinalis*) improves hepatic and renal oxidative stress and the inflammatory response in hypothyroid female wistar rats fed with a high-fat diet. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, v. 29, n. 2, p. 175-184, 2018.

MYERS, Martin G.; COWLEY, Michael A.; MÜNZBERG, Heike. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 70, p. 537-556, 2008.

NARANJO, Víctor et al. Specific Deletion of the Astrocyte Leptin Receptor Induces Changes in Hippocampus Glutamate Metabolism, Synaptic Transmission and Plasticity. **Neuroscience**, 2019.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19· 2 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377-1396, 2016.

NORONHA, S. S. R. et al. Association of high-fat diet with neuroinflammation, anxiety-like defensive behavioral responses, and altered thermoregulatory responses in male rats. **Brain, behavior, and immunity**, v. 80, p. 500-511, 2019.

NGAMLERST, Chattraya et al. The potential of antioxidant-rich Maoberry (*Antidesma bunius*) extract on fat metabolism in liver tissues of rats fed a high-fat diet. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2019

PAIM, Raquel Teixeira Terceiro et al. p-Methoxycinnamic Acid Diesters Lower Dyslipidemia, Liver Oxidative Stress and Toxicity in High-Fat Diet Fed Mice and Human Peripheral Blood Lymphocytes. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 262, 2020.

PECORARO, N., Reyes, F., Gomez, F., Bhargava, A., & Dallman, M. F. (2004). Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. **Endocrinology**, 145(8), 3754-3762.

PENTKOWSKI, Nathan S. et al. Effects of estrus cycle stage on defensive behavior in female Long-Evans hooded rats. **Physiology & behavior**, v. 194, p. 41-47, 2018.

PIBIRI, F. et al. Decreased corticolimbic allopregnanolone expression during

PRASAD, A., & Prasad, C. (1996). Short-term consumption of a diet rich in fat decreases anxiety response in adult male rats. **Physiology & behavior**, 60(3), 1039-1042.

OU, Christina; DRINGENBERG, Hans C.; SOUTAR, Chloe N. Is hippocampal theta frequency related to individual and sex differences in anxiety-like behaviour? An analysis in male and female Long-Evans rats. **Behavioural brain research**, v. 364, p. 366-373, 2019

RAMOS-ORTOLAZA DL, Doreste-Mendez RJ, Alvarado-Torres JK, Torres-Reveron A. (2017) Ovarian hormones modify anxiety behavior and glucocorticoid receptors after chronic social isolation stress. **Behav Brain Res**. 328:115-122.

ROMO-ARAIZA, A., Gutiérrez-Salmeán, G., Galván, E. J., Hernández-Frausto, M., Herrera-López, G., Romo-Parra, H., ... & Ibarra, A. (2018). Probiotics and prebiotics as a therapeutic strategy to improve memory in a model of middle-aged rats. **Frontiers in aging neuroscience**, 10, 416.

SCHOLL, Jamie L. et al. Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. **Physiology & behavior**, v. 211, p. 112670, 2019.

S.F. XIA, Z.X. XIE, Y. QIAO, L.R. Li, X.R. CHENG, X. TANG, et al., Differential effects of quercetin on hippocampus-dependent learning and memory in mice fed with different diets related with oxidative stress, **Physiol. Behav.** 138 (2015) 325–331.

SAMARA, Amjad et al. Neuroinflammation and White Matter Alterations in Obesity Assessed by Diffusion Basis Spectrum Imaging. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 13, p. 464, 2020.

SARPARANTA, Jaakko; GARCIA-MACIA, Marina; SINGH, Rajat. Autophagy and mitochondria in obesity and type 2 diabetes. **Current diabetes reviews**, v. 13, n. 4, p. 352-369, 2017.

SCHÜLE, Cornelius; NOTHDURFTER, Caroline; RUPPRECHT, Rainer. The role of allopregnanolone in depression and anxiety. **Progress in neurobiology**, v. 113, p. 79-87, 2014.

SELLAYAH, Dyan; CAGAMPANG, Felino R.; COX, Roger D. On the evolutionary origins of obesity: a new hypothesis. **Endocrinology**, v. 155, n. 5, p. 1573-1588, 2014.

SHOAI, Muhammad et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. **Carbohydrate polymers**, v. 147, p. 444-454, 2016.

SINGH, Arashdeep et al. Dietary lactalbumin and lactoferrin interact with inulin to modulate energy balance in obese rats. **Obesity**, v. 25, n. 6, p. 1050-1060, 2017.

SINGH, Arashdeep et al. Inulin fiber dose-dependently modulates energy balance, glucose tolerance, gut microbiota, hormones and diet preference in high-fat-fed male rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 59, p. 142-152, 2018.

SIVANATHAN, Shathveekan et al. Chronic high fat feeding increases anxiety-like behaviour and reduces transcript abundance of glucocorticoid signalling genes in the hippocampus of female rats. **Behavioural brain research**, v. 286, p. 265-270, 2015.

social isolation enhances contextual fear: A model relevant for posttraumatic

SPEAKMAN, John R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. **Nature**.2019.

SWINBURN, Boyd A. et al. The global syndemic of obesity, undernutrition, and climate change: the Lancet Commission report. **The Lancet**, v. 393, n. 10173, p. 791-846, 2019.

TERRIEN, Jérémy et al. Reduced central and peripheral inflammatory responses and increased mitochondrial activity contribute to diet-induced obesity resistance in WSB/EiJ mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2019.

THOMSON, I. S. I. Huda AO Al-Jumayi, Hassan A. Elhendy and Amira MG Darwish. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 150-158, 2020.

TUCKER, Larry A.; KANO, Marshall J. Dietary fat and body fat: a multivariate study of 205 adult females. **The American journal of clinical nutrition**, v. 56, n. 4, p. 616-622, 1992.

VALCARCEL-ARES, Marta Noa et al. Obesity in aging exacerbates neuroinflammation, dysregulating synaptic function-related genes and altering eicosanoid synthesis in the mouse hippocampus: potential role in impaired synaptic plasticity and cognitive decline. **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 74, n. 3, p. 290-298, 2019.

VUKOVIĆ, Rosemary et al. Impact of ovariectomy, high fat diet, and lifestyle modifications on oxidative/antioxidative status in the rat liver. **Croatian medical journal**, v. 55, n. 3, p. 218-227, 2014

VAN BAAK, Marleen A.; MARIMAN, Edwin CM. Mechanisms of weight regain after weight loss—the role of adipose tissue. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 274-287, 2019.

VILLA, Alessandro et al. Estrogens, neuroinflammation, and neurodegeneration. **Endocrine reviews**, v. 37, n. 4, p. 372-402, 2016.

WANG, Jian-Ping et al. Vanadium in high-fat diets sourced from egg yolk decreases growth and antioxidative status of Wistar rats. **Animal Nutrition**, v. 5, n. 3, p. 307-313, 2019.

WARNEKE, Wiebke et al. The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague–Dawley rats of different ages. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 116, p. 45-54, 2014.

WHO. Obesity and overweight. World Health Organization 2018 [cited 2018 fev 29]; Available from: URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesityand-overweight>.

WILLIAMS, Ariel; GREENE, Natasha; KIMBRO, K. Increased circulating cytokine levels in African American women with obesity and elevated HbA1c. **Cytokine**, v. 128, p. 154989, 2020.

WU, Yin hao Violet; BURNHAM, W. McIntyre. Progesterone, 5 $\alpha$ -dihydropogesterone and allopregnanolone's effects on seizures: A review of animal and clinical studies. **Seizure**, v. 63, p. 26-36, 2018.

XU, Liu et al. High-fat diet mediates anxiolytic-like behaviors in a time-dependent manner through the regulation of SIRT1 in the brain. **Neuroscience**, v. 372, p. 237-245, 2018.

XUE, Jing et al. Inulin and metformin ameliorate polycystic ovary syndrome via anti-inflammation and modulating gut microbiota in mice. **Endocrine journal**, v. 66, n. 10, p. 859-870, 2019.

YOEST, Katie E.; CUMMINGS, Jennifer A.; BECKER, Jill B. Ovarian hormones mediate changes in adaptive choice and motivation in female rats. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 13, p. 250, 2019.

ZHANG, Tao et al. Renalase Attenuates Mouse Fatty Liver Ischemia/Reperfusion Injury through Mitigating Oxidative Stress and Mitochondrial Damage via Activating SIRT1. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

ZHANG, Y., & Chua Jr, S. (2011). Leptin function and regulation. *Comprehensive Physiology*, 8(1), 351-369.

ZHAO, Yulong et al. No effect of sex and estrous cycle on the fear potentiated startle response in rats. **Behavioural brain research**, v. 351, p. 24-33, 2018.

ZHOU, Heping; URSO, C. J.; JADEJA, Viren. Saturated Fatty Acids in Obesity-Associated Inflammation. **Journal of Inflammation Research**, v. 13, p. 1, 2020.

ZHU, Chong-gui et al. Active form of vitamin D ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by alleviating oxidative stress in a high-fat diet rat model. **Endocrine journal**, v. 64, n. 7, p. 663-673, 2017.

ZOU, Jun et al. Fiber-mediated nourishment of gut microbiota protects against diet-induced obesity by restoring IL-22-mediated colonic health. **Cell host & microbe**, v. 23, n. 1, p. 41-53. e4, 2018.

