



Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde
Mestrado e Doutorado - UNISUL

GABRIELA GUZATTI FRANCISCO

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE MEMÓRIA EM MODELO ANIMAL DE
OBESIDADE INDUZIDO POR DIETA HIPERLIPÍDICA**

TUBARÃO

2016

GABRIELA GUZATTI FRANCISCO

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE MEMÓRIA EM MODELO ANIMAL DE
OBESIDADE INDUZIDO POR DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Profa. Gislaine Tezza Rezin, Dra.

TUBARÃO

2016

Francisco, Gabriela Guzatti, 1991-
F89 Avaliação de parâmetros de memória em modelo animal
de obesidade induzido por dieta hiperlipídica / Gabriela Guzatti
Francisco; -- 2016.
59 f.il. color. ; 30 cm

Orientadora : Gislaine Tezza Rezin.
Dissertação (mestrado)–Universidade do Sul de Santa
Catarina, Tubarão, 2016.
Inclui bibliografias.

1. Obesidade. 2. Memória. 3. Metabolismo energético.
4. Dieta. 5. Enzimas. I. Rezin, Gislaine Tezza. II. Universidade
do Sul de Santa Catarina – Mestrado em Ciências da Saúde. III.
Título.

CDD (21. ed.) 616.398

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Ele, que me proporcionou saúde, motivação, e iluminou o meu caminho, tornando possível a conclusão de mais essa etapa.

Àqueles que são meu orgulho, exemplos a serem seguidos, que me mostram os reais valores da vida: à minha família. Principalmente a minha mãe Romilde Guzatti e meu pai Valério Francisco, obrigada. À minha irmã Camilla Guzatti, sempre presente.

Agradeço ao meu amado, Gustavo Bitencourt, pelo amparo, afeto, companheirismo. Por me dar forças, não permitir que eu desista, por andar do meu lado, por querer crescer junto, viver junto.

À professora Gislaine Tezza Rezin, orientadora que me recebeu de braços abertos, e me mostrou o 'mundo' da pesquisa, por suas contribuições e paciência, obrigada.

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, cujos ensinamentos foram fundamentais para minha formação. Agradecimento especial à professora Clarissa Comin, pelo auxílio no experimento, e às professoras Jucélia Jeremias Fortunato e Josiane Somariva Prophiro pelas contribuições no processo qualificação desta pesquisa.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário Unisul, principalmente às colegas Nicole Hlavac e Sílvia Rezende Terra, pelo incentivo e compreensão.

Agradecimento a todo pessoal do Neuroimet, núcleo obesidade, por toda a ajuda nos experimentos. Em especial à Aline Haas de Mello, Rosiane Schraiber e Luana Souza, pelas conversas, discussões, apoio e amizade. Também ao grupo do laboratório de Neurociências (UNESC), pelo auxílio nas análises.

Aos demais amigos e colegas que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Introdução: As taxas de obesidade no mundo estão atingindo proporções alarmantes. Além das consequências nos tecidos periféricos, a obesidade pode comprometer inclusive estruturas cerebrais, levando à déficits cognitivos, especialmente relacionados à memória. **Objetivo:** Avaliar parâmetros de memória em modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. **Métodos:** Foi utilizado camundongos Swiss, com 40 dias de idade, randomizados em dois grupos. Grupo controle que recebeu dieta normolipídica e grupo obeso que recebeu dieta hiperlipídica durante 10 semanas. A confirmação da obesidade nos animais foi avaliada através do peso corporal e peso da gordura visceral. Ao final da indução os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos e esQUIVA inibitória, foram pesados e mortos por decapitação, a cavidade abdominal aberta e retirada a gordura visceral. Após, o tecido cerebral do hipocampo e córtex pré-frontal foi removido para as análises bioquímicas da atividade de acetilcolinesterase e cadeia respiratória mitocondrial. **Resultados:** O peso corporal e a gordura mesentérica dos animais do grupo obeso foram maiores comparado com os controles. Os animais obesos não apresentaram prejuízos na memória de reconhecimento de objetos e aversiva quando comparados com os controles. Atividade da acetilcolinesterase não apresentou diferença entre o grupo controle e obeso no hipocampo e córtex pré-frontal. A atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória mitocondrial e creatina quinase foi inibida no hipocampo e córtex pré-frontal dos obesos quando comparado com o grupo controle. **Conclusão:** A obesidade foi capaz de inibir a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e creatina quinase no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos obesos, sugerindo que a produção de energia neuronal possa estar alterada nesses animais. No entanto, essa inibição não foi suficiente para afetar a atividade da acetilcolinesterase nessas estruturas, nem a memória de reconhecimento de objetos e aversiva nesse modelo animal.

Descritores: obesidade, dieta hiperlipídica, memória, acetilcolinesterase, metabolismo energético.

ABSTRACT

Introduction: The obesity rates have reached alarming proportions in the world. In addition to the effects in peripheral tissues, obesity may also affect brain structures leading to cognitive deficits especially related to memory. Objective: Evaluate memory parameters in a model animal of obesity induced by high fat diet. Methods: 40-day-old Swiss mice were randomized into two groups. The control group received control diet and the obese group received high fat diet for 10 weeks. The confirmation of obesity in animals was defined by body weight and visceral fat weight. All animals were submitted to object recognition test and inhibitory avoidance, weighed and then killed through fast decapitation. The abdominal cavity was incised, and the visceral fat was removed. After the brain removal, the hippocampus and prefrontal cortex were separated by dissection for biochemical analysis of acetylcholinesterase activity and mitochondrial respiratory chain. Results: Body weight and mesenteric fat of the animal obese group was higher if compared with controls. The obese animals had no loss in object recognition and aversive memory when compared with controls. Acetylcholinesterase activity presented no difference between the control group and obese in the hippocampus and prefrontal cortex. The activity of complex I, II and IV of the mitochondrial respiratory chain, and creatine kinase of the obese group was inhibited in the prefrontal cortex and hippocampus when compared to the control group. Conclusion: Obesity was able to inhibit the activity of mitochondrial respiratory chain complex and creatine kinase in the prefrontal cortex and hippocampus of obese mice, implying that neuronal energy production may be affected in these animals. However, this inhibition was not enough to affect neither the activity of acetylcholinesterase in these structures nor the recognition memory objects and aversive in this animal model.

Keywords: obesity, diet high-fat, memory, acetylcholinesterase, energy metabolism.

LISTAS

Lista de abreviaturas

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ADP – Adenosina difosfato (do inglês *adenosine diphosphate*)

AGL – Ácidos graxos livres

ATP – Adenosina trifosfato (do inglês *adenosine triphosphate*)

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês *Brain derived Neurotrophic Factor*)

CK – Creatina quinase (do inglês *creatine kinase*)

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DBCA – Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FAD – Flavina-adenina-dinucleotídeo

FOX – Fosforilação oxidativa

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL-10 – Interleucina 10 (do inglês *interleukin 10*)

IL-6 – Interleucina 6 (do inglês *interleukin 6*)

IMC – Índice de Massa Corporal

MCD – Memória de Curta Duração

MLD – Memória de Longa Duração

NAD – Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo

OMS – Organização Mundial da Saúde

RBP4 – Proteína Ligante de Retinol 4 (do inglês *retinol binding protein 4*)

SNC – Sistema Nervoso Central

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa (do inglês *tumor necrosis fator alpha*)

VIGITEL – Vigilância de Fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

Lista de figuras

Figura 1– Hipertrofia do tecido adiposo acarretando inflamação e provocando alterações na homeostase de tecidos, aumentando a ingestão alimentar, acúmulo ectópico de gordura e resistência à insulina e leptina.	17
Figura 2 – Sistemas de memórias representados por uma sequência de etapas a partir de um novo evento	21
Figura 3 – Eventos do sistema colinérgico entre neurônios pré e pós sinápticos representando a degradação da ACh pela AChE	24
Figura 4 – Cadeia transportadora de elétrons até a produção final de ATP	26
Figura 5 – Fonte alternativa de ATP através da ação da enzima CK	27
Figura 6 – Desenho experimental representado pela sequência de eventos diferenciando os dois processos de testes comportamentais	30
Figura 7 – Avaliação do peso corporal	36
Figura 8 – Avaliação da gordura visceral da região mesentérica.....	37
Figura 9 – Avaliação da memória de reconhecimento de objetos.....	37
Figura 10 – Avaliação da memória aversiva	38
Figura 11 – Avaliação da atividade das AChE no hipocampo e córtex pré-frontal...	38
Figura 12 – Avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo e córtex pré-frontal.....	39
Figura 13 – Avaliação do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo e córtex pré-frontal.....	39
Figura 14 – Avaliação do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo e córtex pré-frontal.....	40
Figura 15 – Avaliação da CK no hipocampo e córtex pré-frontal	40

Lista de tabelas

Tabela 1– Ponto de corte entre os valores de IMC, sua classificação e o risco de desenvolver outras comorbidades	14
Tabela 2 – Composição das dietas e valor calórico a cada 1000g (1KG) de ração. .	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	11
1.1.1 Obesidade	11
1.1.1.1 Epidemiologia	12
1.1.1.2 Diagnóstico	13
1.1.1.3 Fisiopatologia	15
1.1.2 Memória	19
1.1.2.1 Sistema colinérgico	23
1.1.2.2 Cadeia respiratória mitocondrial	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MÉTODOS	29
3.1 TIPO DE ESTUDO	29
3.2 ANIMAIS	29
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
3.3.1 Modelo animal de obesidade	30
3.3.1.1 Confirmação da obesidade	31
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	31
3.4.1 Reconhecimento de objetos	31
3.4.2 Esquiva Inibitória	32
3.5 REMOÇÃO E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS	33
3.6 ATIVIDADE DA AChE	33
3.7 ATIVIDADE DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL	34
3.8 ATIVIDADE DA CREATINA QUINASE	34
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
3.10 ASPECTOS ÉTICOS	35
4. RESULTADOS	36
5. DISCUSSÃO	41
4. CONCLUSÃO	45

REFERÊNCIAS.....46
ANEXOS57

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como o acúmulo de gordura anormal ou excessivo no tecido adiposo que reflete algum risco para a saúde do indivíduo e é considerada um problema para a saúde pública ¹. A causa principal do sobrepeso e obesidade está relacionada com o desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e gastas, e com o sedentarismo característico do mundo globalizado ¹. Esse desequilíbrio está associado com o volume de alimentos ingeridos, frequência com que são ingeridos, fatores sociais, ambientais e comportamentais ^{2,3}.

As taxas de obesidade vêm aumentando nos últimos tempos, e o número de obesos dobrou desde 1980 ⁴, tomando proporções epidêmicas em todo o mundo ^{4,5}. Dados sobre a obesidade se tornaram alarmantes, uma vez que são responsáveis por ocasionar outros tipos de prejuízos, aumentando significativamente o risco de outras doenças, como as coronárias e cerebrovasculares, alguns tipos de câncer, Diabetes *Mellitus* tipo 2, hipertensão, doenças hepáticas e respiratórias, comprometendo a qualidade de vida e a longevidade da população ^{1,6}.

Sabe-se que a obesidade, ou o excesso de alimentos ricos em gorduras saturadas, têm grandes efeitos no metabolismo energético. O excesso de gordura, quando ingerido, acaba se acumulando no tecido adiposo e abre caminho para agentes que desestabilizam as funções de vários órgãos como, fígado, pâncreas, músculo e sistema nervoso central (SNC), controlador da fome e da saciedade. Estudos mostram que os efeitos da obesidade no SNC podem ser causados por um processo inflamatório que tem início na periferia, com um desbalanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias, que por sua vez é capaz de causar danos diretos as estruturas neurais ^{7,8}. O comprometimento de estruturas cerebrais na obesidade vem sendo estudados, principalmente sua relação com déficits cognitivos, especialmente aqueles relacionados a memória ^{5,9,10}.

Evidências sugerem que diversos mecanismos são susceptíveis de vincular obesidade e déficit cognitivo, supondo que a inflamação sistêmica e central presentes na obesidade podem convergir em uma via final comum levando ao comprometimento de estruturas responsáveis pela memória ^{11,12}. Isso acontece devido as alterações envolvidas na fisiopatologia da obesidade, com o aumento de citocinas pró-inflamatórias ¹³⁻¹⁵, bem como presença de estresse oxidativo ¹⁶, dano

ao ácido desoxirribonucleico (DNA) ^{17,18}, diminuição na expressão de genes mitocondriais ¹⁹, fornecendo menos energia para as células neurais realizarem suas funções ²⁰.

Ainda, os sistemas envolvidos no processo de memória, dependem do bom funcionamento do SNC que, transmitem informações aos neurônios através de neurotransmissores específicos, como acetilcolina, dopamina, noradrenalina, serotonina e glutamato ²¹. Nesse sentido, a acetilcolinesterase (AChE), enzima que degrada o neurotransmissor acetilcolina, é importante para o funcionamento do SNC, já que é responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos ²², e está associada ao desenvolvimento encefálico, aprendizagem, memória e dano neuronal ²¹.

Assim, o consumo excessivo de alimentos ricos em gordura saturada, além de estar relacionado com doenças metabólicas em consequência do sobrepeso, está associada com o comprometimento de estruturas neurais com função de formar, armazenar e evocar memórias ^{11,23-25}. Há evidências ainda, que relacionam a obesidade com alguns tipos de demências, como a doença de Alzheimer, pela atrofia cerebral nessas estruturas ²⁶.

Considerando o número de indivíduos com sobrepeso e obesos, o risco de desenvolver outras doenças associadas e o impacto econômico para a saúde pública ^{1,27}, apresenta-se a necessidade de conhecer mais sobre a fisiopatologia desta doença e os danos causados por ela. É importante entender os efeitos da obesidade no SNC, principalmente em estruturas responsáveis pela memória, uma vez que este fator está fortemente relacionado aos processos de aprendizagem ²⁵.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Obesidade

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que pode atingir graus capazes de afetar a saúde do indivíduo ¹. Pode ser relacionada com a quantidade e a frequência de alimentos ingeridos e o gasto de energia proveniente deles. Assim, o aumento do peso corporal é resultante do aumento de consumo de calorias, que

consequentemente resulta num acréscimo de ingestão de energia, que por sua vez não são totalmente gastos ².

Os problemas oriundos da obesidade surgem quando os padrões de alimentação que deveriam atender as necessidades de forma adequada são adotados de forma crônica ³. As mudanças nesses padrões se devem ainda, à diversidade de alimentos ofertados no mercado e a ingestão de bebidas ricas em açúcares ²⁸⁻³⁰.

O sedentarismo também é um agravante para os casos de obesidade. O atual estilo de vida acarretou um modelo de sedentarismo que não se resume apenas na quantidade de calorias gastas, mas sim no excesso de calorias que é ingerido ao realizarmos certas atividades rotineiras como assistir televisão, ouvir música, jogar videogame, e exercer alguns trabalhos cognitivos, por exemplo. Essas práticas fazem com que os alimentos sejam ingeridos na ausência de fome, e na maioria das vezes em excesso ³¹.

Os padrões alimentares adotados pela sociedade podem resultar ou serem alterados por diversas escolhas de estilo de vida e condições de saúde. Fatores como mudança de rotina, exercício, hábito de sono, trabalho em turnos e transtornos alimentares têm sido descritos como elementos determinantes na transformação desses padrões ³.

1.1.1.1 Epidemiologia

De acordo com a OMS, nos últimos 35 anos, o número de obesos mais que duplicou em todo o mundo, tomando proporções epidêmicas ¹. O sobrepeso e a obesidade estão elevando o risco de morte em todo o planeta. Em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos de 18 anos ou mais estavam acima do peso e, destes, mais de 600 milhões eram obesos, ou seja, 39% dos adultos estavam acima do peso, e 13% da população adulta era obesa ¹. Com relação aos dados infantis, 42 milhões de crianças com menos de 5 anos de idades estavam acima do peso ou obesos em 2013. E, uma vez considerado um problema de países desenvolvidos, o excesso de peso e obesidade estão agora em ascensão em países de baixa e média renda, especialmente em ambientes urbanos ¹.

No Brasil, medidas antropométricas obtidas na última “Pesquisa de Orçamentos Familiares”, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e

Estatísticas (IBGE) ³², em 2008-2009 traz informações importantes a respeito do estado nutricional da população brasileira de crianças, adolescentes e adultos. Esse estudo aponta que, o excesso de peso e a obesidade, em todas as idades, são problemas de grande relevância para a saúde pública no Brasil. O excesso de peso entre os homens acima dos 20 anos ultrapassa metade da população em três regiões do país: Sul (56%), Sudeste (52,4%) e o Centro Oeste (51%). Enquanto o excesso de peso entre as mulheres ultrapassa a metade da população apenas na região Sul (51,6%) ³².

Ainda, um outro estudo realizado pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) de 2013, nas 26 capitais de estados e no Distrito Federal, apontou que, na população adulta a frequência de excesso de peso foi de 51%, sendo maior entre homens (54,5%) em comparação com as mulheres (48,1%). Já no conjunto da população adulta dessas cidades do estudo, a frequência de adultos obesos foi de 17,4% considerando ambos os sexos ⁵.

Houve acréscimo nesses valores, publicados recentemente pela VIGITEL no ano de 2014 ³³, onde o número de indivíduos com excesso de peso passou para 52,5% e quadros de obesidade acometeram 17,9% da população. Na estimativa de percentual de adultos com excesso de peso nas capitais do Brasil, em Florianópolis esse número ultrapassa metade da população (51%), já em relação a dados de obesidade, Florianópolis é a capital com menor índice de obesos (14%) ³³.

A partir dos dados que se tem sobre a obesidade no mundo, preocupações são levantadas sobre a propensão desses indivíduos desenvolverem outras comorbidades, tais como doenças coronárias e cerebrovasculares, alguns tipos de câncer, Diabetes *Mellitus* tipo 2, hipertensão, doenças do fígado, asma, entre outras ^{1,6}. Além disso, estudos recentes relacionam a obesidade com efeitos cognitivos adversos ^{9,10,34} e o risco de demências, tais como a doença de Alzheimer ¹².

1.1.1.2 Diagnóstico

Atualmente o diagnóstico de obesidade se dá através do Índice de Massa Corporal (IMC), que funciona como um guia básico para avaliar a obesidade e o sobrepeso. Esse índice é definido como o peso da pessoa em quilos dividido pelo

quadrado de sua altura em metros (kg/m^2) e, de acordo com esse resultado, se tem pontos de corte, com algumas classificações, que determinam em que estágio o indivíduo se encontra ¹.

Essas classificações se distinguem em baixo peso, peso normal, sobrepeso e obesidade (grau I, II e III). A partir destes índices também é possível fazer uma associação entre o IMC e sua classificação, onde aponta para o risco de desenvolver outras doenças. Essa classificação é adotada pela OMS e apresentada na tabela 1, que se baseia em padrões internacionais desenvolvidos para adultos ³⁵.

Tabela 1 - Ponto de corte entre os valores de IMC, sua classificação e o risco de desenvolver outras comorbidades.

IMC	Classificação	Risco de comorbidades
< 18,5	Baixo peso	Baixo
18,5 – 24,9	Peso normal	Médio
25,0 – 29,9	Sobrepeso	Aumentado
30,0 – 34,9	Obesidade Grau I	Moderado
35,0 – 39,9	Obesidade Grau II	Grave
> 40,0	Obesidade Grau III	Muito grave

Fonte: Adaptado de OMS, 2000 ³⁵.

Esta classificação, porém, não faz distinção entre mulheres e homens, e entre as idades. O IMC deve ser considerado como um guia geral, no entanto, ele pode não corresponder ao real nível de gordura em diferentes indivíduos e populações, devido as suas particularidades e por não distinguir massa magra de massa gorda, não sendo um método diagnóstico muito confiável ¹.

Existem outras formas de avaliar a massa gordurosa corporal e sua distribuição, como testes de imagem (Ultrassonografia, Tomografia computadorizada e Ressonância magnética). No entanto, a mais comumente usada, junto com o IMC para diagnóstico de obesidade é a medida da circunferência abdominal, que reflete melhor o conteúdo de gordura visceral e se associa muito à gordura corporal total ³⁶. A medida da distribuição da gordura é importante na avaliação de sobrepeso e obesidade porque a gordura visceral (intra-abdominal) é um fator de risco potencial para doenças ³⁶, como as cardiovasculares ³⁷.

Utilizando-se da medida de circunferência abdominal como auxílio na classificação de obesidade, temos um ponto de corte baseado em homens e mulheres caucasianos, que pode ser seguido usualmente. A obesidade por meio de circunferência abdominal em homens é considerada maior que 102 centímetros e em mulheres quando a medida é maior que 88 centímetros ³⁶.

1.1.1.3 Fisiopatologia

O acúmulo de gordura depende do balanço entre a sua síntese e a sua degradação, lipogênese e lipólise de ácidos graxos, respectivamente. O depósito de gordura é resultado de um balanço energético positivo crônico que leva gradativamente ao aumento da massa de tecido adiposo ²².

O tecido adiposo é um órgão multicelular e funciona como isolante térmico, barreira física ao trauma, capacidade de regulação do armazenamento e da distribuição de gordura, controlando o estoque energético, além de comunicação com o SNC e o trato gastrointestinal, desempenhando importante papel na resposta inflamatória em condições tanto autócrinas, quanto parácrinas ou endócrinas ^{38,39}. Esse tecido secreta inúmeros peptídeos e proteínas biologicamente ativas, chamadas de adipocinas, tendo impacto sobre vários aspectos biológicos e atuando como imunomoduladores ⁴⁰.

O organismo tem o poder de armazenar gordura necessária para períodos de carência de alimentos ⁴¹. Porém, quando não existe esse período de espera, as células começam a armazenar mais gordura que o necessário nos adipócitos em todo o corpo, processo conhecido como hipertrofia dos adipócitos, o que pode resultar em obesidade ⁴². Isso acontece, pois, em períodos de abundância de calorias, os ácidos graxos livres são armazenados na forma de triacilglicerol através da sua esterificação com o glicerol e nos momentos de carência de energia, estes são liberados de volta para a circulação. A elevação da massa adiposa ocorrida na obesidade é determinada pelo aumento do tamanho do adipócito como também do seu número, fenômeno conhecido como hiperplasia ⁴³.

A hipertrofia, relacionada ao aumento do volume da célula adiposa, possui alta correlação com a obesidade, pois ocasiona uma redução no fluxo sanguíneo com consequente hipóxia, infiltração e ativação de macrófagos no tecido adiposo ⁴³. Isso, por sua vez, culmina num aumento do processo inflamatório crônico

de baixa intensidade ^{13,44,45}. Embora o real papel das adipocinas em síndrome metabólica esteja em discussão, um desequilíbrio entre o aumento dos estímulos inflamatórios e diminuição de mecanismos anti-inflamatórios pode ser considerado uma hipótese interessante para os transtornos decorrentes do consumo de dietas ricas em calorias ⁴⁵. Em consequência desse processo de infiltração de macrófagos, produção aumentada de adipocinas e ao aumento da inflamação, há produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α do inglês *tumor necrosis factor alpha*) e interleucina 6 (IL-6 do inglês *interleukin 6*). Esse processo, então, é acompanhado de liberação de ácidos graxos livres e desregulação da secreção de leptina, insulina, adiponectina, resistina e proteína ligante de retinol 4 (RBP4 do inglês *retinol binding protein 4*). Juntas, essas substâncias derivadas dos adipócitos e macrófagos podem agir de forma parácrina ou autócrina, agravando a inflamação do tecido adiposo. Em decorrência desse processo, todo o mecanismo que deveria ser controlado acaba sendo alterado, influenciando a sensibilidade à insulina, que interfere na homeostase glicêmica, com consequências diretas sobre o peso corporal ^{46,47}.

Pesquisas afirmam que outros tecidos além do adiposo apresentam altos níveis de expressão de citocinas, como pâncreas, fígado, músculo e encéfalo ^{7,48,49}. Em nível sistêmico, a secreção alterada de adipocinas como adiponectina, leptina e resistina, podem levar ao aumento na ingestão alimentar e a redução do gasto energético através de ações diretas no hipotálamo. Além disso, a sensibilidade à insulina diminui no músculo e no fígado através do aumento ectópico da deposição de lipídios associado ao desenvolvimento da inflamação ¹³. O resumo destes mecanismos segue ilustrado na figura 1.

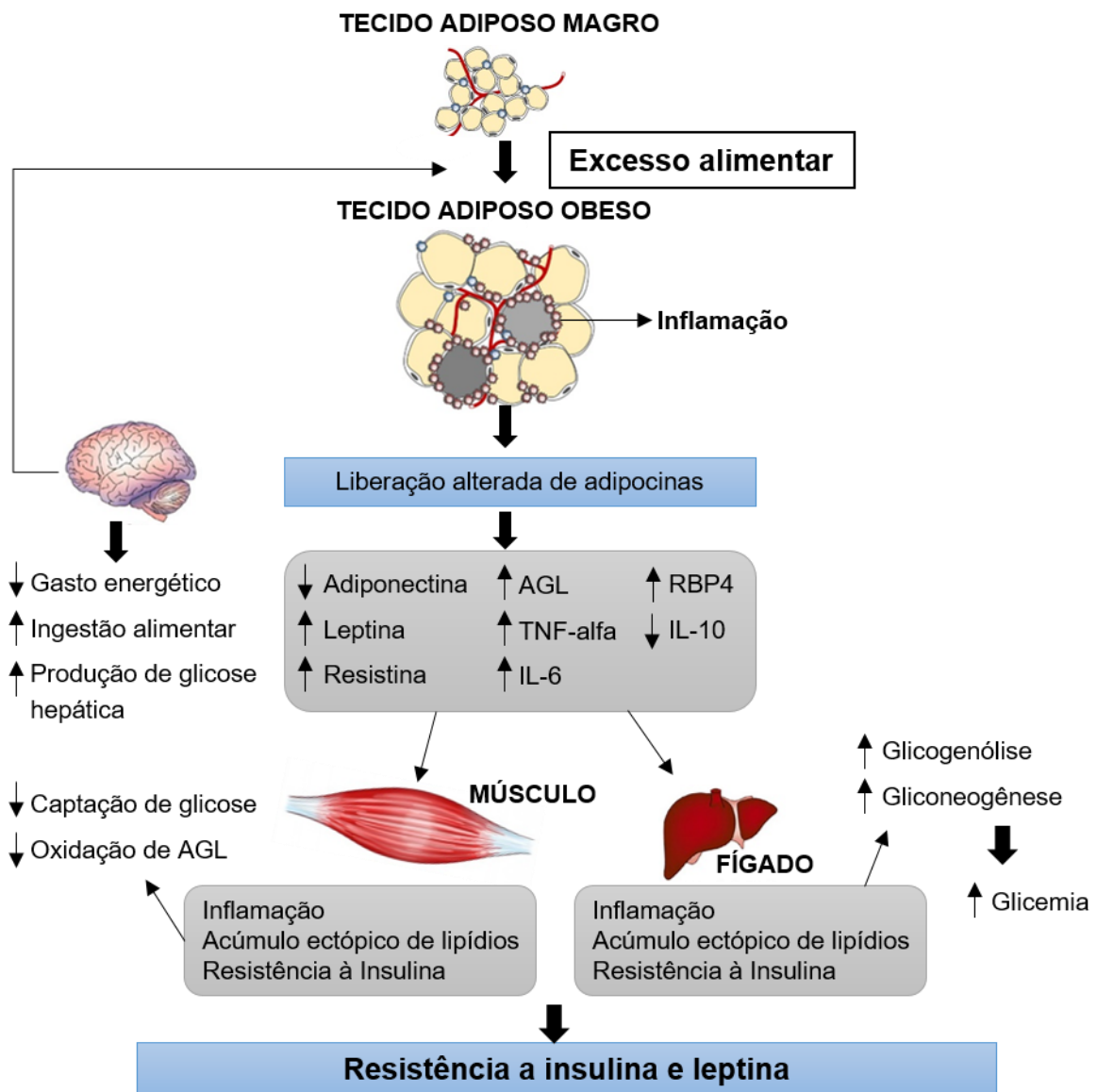


Figura 1 – Hipertrofia do tecido adiposo causando inflamação e provocando alterações na homeostase de tecidos, aumento da ingestão alimentar, acúmulo ectópico de gordura e resistência à insulina e leptina. AGL (ácidos graxos livres); TNF-alfa (fator de necrose tumoral alfa); IL-6 (interleucina 6); RBP4 (proteína ligante de retinol 4); IL-10 (interleucina 10).

Fonte: Adaptada de Galic e colaboradores, 2010 ¹³.

Associação da obesidade com inflamação vem sendo realizadas ¹³⁻¹⁵ e ainda, dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid*) ^{17,18} e diminuição na expressão de genes mitocondriais ¹⁹. Além disso, foram confirmados a presença de estresse oxidativo no hipocampo de modelos animais ^{16,50-52}.

Essa desregulação do metabolismo celular é um contribuinte para a disfunção metabólica, levando o indivíduo a um distúrbio vascular na hipertensão e dislipidemia ⁴¹. Não obstante, o processo inflamatório que se desencadeia em tecidos periféricos também é observado no SNC, que têm efeitos no controle da ingestão alimentar e no gasto energético ⁵³, por meio de um circuito de neurotransmissores e neuromoduladores ⁴⁰. Alterações decorrentes do consumo excessivo de alimentos incluem prejuízo no controle da glicose, níveis reduzidos de neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF do inglês *Brain derived neurotrophic factor*) responsáveis pela sobrevivência de neurônios, neuroinflamação e alterações na integridade da barreira hematoencefálica, devido a alteração nos níveis de citocinas ^{25,54}.

O encéfalo, especificamente o hipotálamo, responde a sinais endócrinos e metabólicos, incluindo-se os próprios nutrientes, a insulina liberada pelo pâncreas e a leptina secretada pelo tecido adiposo ^{44,55}. Associações entre obesidade e anormalidades no hipotálamo vem sendo avaliadas a algum tempo, uma vez que dietas ricas em gorduras lesionam essa estrutura pelo processo inflamatório, trazendo consequências para suas funções ^{7,8,15,44,56}. Assim, existindo um descontrole neural devido a essa inflamação, conseqüentemente, haverá um agravamento do caso de obesidade ⁵⁷. Thaler e colaboradores afirmam que o consumo de dieta rica em gordura é caracterizado por inflamação, tanto em tecidos periféricos como em certas áreas do hipotálamo, fundamentais na homeostase energética ¹⁵.

Os sinais hormonais, como a insulina e a leptina, produzidos nos tecidos periféricos pela resposta à ingestão de nutrientes tem papel fundamental no controle da fome e, conseqüentemente, do consumo energético, pois agem sobre os circuitos neurais do SNC ^{7,58}. A leptina é o mais importante sinal periférico de saciedade, pois estabelece uma conexão direta entre o estoque de energia e o SNC, pois é sintetizada pelo tecido adiposo e atua no cérebro, regulando o equilíbrio energético ⁵⁹. Quando há alteração na produção desse hormônio ou de seu receptor, que resultem na perda funcional do sistema, levam a quadros graves de obesidade, tanto em animais experimentais quanto em humanos ^{55,60,61}.

Ainda, estudos recentes avaliaram a relação entre obesidade e resistência à insulina ⁶¹⁻⁶³, caracterizado como a incapacidade do hormônio insulínico em manter a homeostase da glicose, o que vem sendo a razão para

condições clínicas adversas como é o caso da Diabetes *Mellitus* tipo 2 e hipertensão ^{65,66}. No SNC, a insulina e a leptina interagem com os receptores hipotalâmicos, favorecendo a saciedade. Indivíduos obesos têm maiores concentrações séricas destes hormônios e apresentam resistência a sua ação, acarretando em perda do controle do comportamento alimentar e intensificando o ganho de peso ⁶⁷.

Embora a relação entre inflamação induzida pela obesidade e função sináptica esteja rapidamente ganhando atenção no hipotálamo ⁶⁸, as consequências da inflamação se estende para outras regiões do cérebro. Pesquisas recentes indicam que o peso corporal excessivo e a obesidade podem ser facilitadores e preditores de doenças neurodegenerativas ^{69,70}. Além do hipotálamo, evidências sugerem uma associação da obesidade com outras estruturas cerebrais, dentre elas o hipocampo, considerado vulnerável a esses processos inflamatórios, pela migração de citocinas ¹². Muitos mecanismos têm sido propostos com relação ao comprometimento comportamental, incluindo alterações hormonais ^{71,72} bem como redução na expressão de fator neurotrófico ^{50,73}.

O hipocampo, é a estrutura envolvida com a cognição, processamento de memória e aprendizagem ¹⁰, o que sugere associar obesidade com disfunção cognitiva ^{11,12}. Em modelos experimentais com roedores não adultos, os efeitos das dietas sobre a cognição e a memória foram considerados consequência de uma possível inflamação no hipocampo, causados por elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias ^{34,74}. Ainda que não esteja totalmente esclarecido a relação do peso corporal e da perda cognitiva, evidências têm demonstrado que o impacto da hiperglicemia e da resistência à insulina, consequências da obesidade, sob a estrutura e função do hipocampo acarreta em perda na plasticidade sináptica, podendo afetar negativamente o desempenho cognitivo ^{75,76}. Ainda, a obesidade pode trazer consequências diretas para outras estruturas cognitivas, incluindo o córtex pré-frontal, também responsáveis pelos processos de aprendizagem, memória e tomada de decisões ⁷⁷.

1.1.2 MEMÓRIA

A memória é a capacidade de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente e que depende diretamente da aprendizagem que, por sua vez, é o processo de aquisição das informações ⁷⁸. O

aprendizado é a aquisição de conhecimento como resultado de experiências, da instrução, ou de ambos ⁷⁹.

Sabe-se que as memórias são codificadas através de neurônios, armazenadas em redes neurais e evocadas por essas mesmas redes ou por outras. Em geral, são moduladas por emoções, pelo nível de consciência e pelos estados de humor ^{80,81}. Levando-se em conta os conteúdos das memórias, podemos distinguir basicamente dois grandes tipos de memórias: memórias declarativas e não declarativas.

As memórias declarativas ou explícitas incluem basicamente o conhecimento do mundo e experiências pessoais e se divide em semântica ou episódica ⁷⁹. As memórias não declarativas ou implícitas, contêm informação que não somos conscientes de possuir e que foi adquirida de forma implícita, tal como o conhecimento de um procedimento automático e a informação adquirida durante paradigmas de condicionamento e habituação. Sua expressão é em grande parte automática ^{79,82}.

De acordo com o tempo de duração, a memória pode ainda, ser estabelecida em dois estágios, denominados memória de curta duração (MCD) e memória de longa duração (MLD) ⁸³. A MCD, dura de segundos a horas, enquanto a MLD retém a informação por dias ou anos ^{80,84}.

Na MCD não há grandes alterações neurais, envolve modificações temporárias na função de sinapses preexistentes, como a variação temporária na quantidade de um neurotransmissor liberado em resposta a um estímulo, ou resposta temporariamente maior da célula pós-sináptica àquele neurotransmissor dentro das vias nervosas afetadas ⁸⁵. Na MLD, depois da aprendizagem, ocorrem alterações nas vias neurais de armazenamento fazendo com que as informações possam ser recuperadas semanas, meses ou anos mais tarde ⁸³. Envolve mudanças funcionais ou estruturais relativamente permanentes entre neurônios existentes no cérebro ⁸⁶. Uma desregulação nesse processamento molecular pode, por sua vez, contribuir para a diminuição da memória, associada com perturbações do desenvolvimento neurológico, cognitivo e neurodegenerativo ⁸⁷.

Para transformar uma MCD em MLD, é preciso que essa informação passe por alguns estágios, ou conjunto de sistemas, representados pela figura 2.

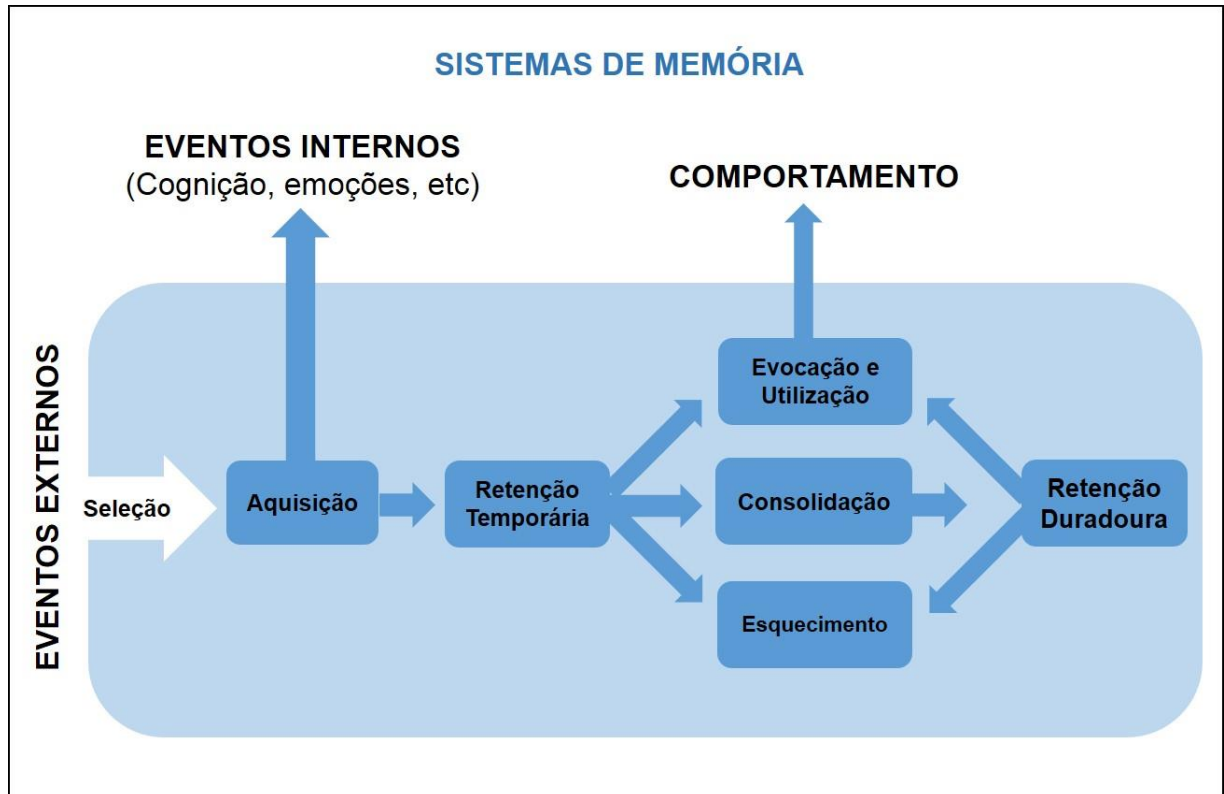


Figura 2 – Sistemas de memórias representados por uma sequência de etapas a partir de um evento novo.

Fonte: Adaptado de Lent, 2004 ⁸⁸.

No geral, as memórias são organizadas em redes distribuídas ao longo do tempo por meio de consolidações ⁸⁹. A consolidação da memória envolve o controle da transcrição de genes nos neurônios para estabilizar uma memória recém-formada ^{87,90,91}. A etapa de consolidação é considerada um processo lento e que sofre mudanças para tornar-se ou não uma memória duradoura. Se a consolidação for efetiva somos capazes de acessar essas lembranças e utilizá-las posteriormente ^{82,94}.

A memória existe em várias formas e é armazenada em várias regiões do cérebro, envolvidos nos traços de memórias, e que estão amplamente distribuídos ao longo das regiões subcortical e cortical do encéfalo ⁹². As regiões mais envolvidas na memória incluem o hipocampo e estruturas associadas nos lobos temporais

mediais, no sistema límbico, no cerebelo, no córtex pré-frontal e em outras áreas do córtex cerebral ^{89,92}.

O hipocampo desempenha papel fundamental na formação de memórias declarativas, tem função vital na MCD e na consolidação em MLD ⁹³. Indivíduos com lesões no hipocampo se esquecem habitualmente de fatos essenciais às atividades diárias e lesões extensas nessa estrutura são encontradas em pacientes com doença de Alzheimer ⁹⁴.

O córtex de associação pré-frontal é a parte dianteira do lobo frontal. Especificamente as funções atribuídas a essa região são: planejamento de atividade voluntária, raciocínio, tomada de decisões, criatividade e traços de personalidade ⁹⁵. O córtex pré-frontal tem sido reconhecido como um sistema neural necessário para tomar decisões vantajosas quando são oferecidas várias opções de alimentos. Indivíduos com essa estrutura lesionada apresentam inabilidade para acessar de maneira vantajosa as consequências futuras, tanto positivas quanto negativas ⁷⁷. Acredita-se que a ingestão alimentar é modulada também pela estruturas límbico-corticais do cérebro, como amígdala e córtex pré-frontal, que dão valores aos alimentos, como sabor, aparência e textura ²⁴.

Assim, as informações ou lembranças que serão armazenadas, temporariamente ou permanentemente, dependem do bom funcionamento do SNC bem como de comunicações efetivas entre os neurônios, que através de impulsos levam as informações de um neurônio a outro, através de sinapses ⁹⁵. As estruturas cerebrais envolvidas na memória e as transmissões que acontecem para formação, armazenamento e evocação da memória são prejudiciais em quadros de obesidade. Estudos mostram que homens e animais obesos e que consomem dietas hiperlipídicas ou hipercalóricas apresentam pior desempenho em testes de aprendizagem e memória, em comparação aos que não possuem excesso de peso e que se alimentam com uma dieta mais equilibrada ^{9,34,96,97}.

O consumo excessivo de alimentos ricos em gorduras saturadas produz uma série de alterações neurofisiológicas capazes de impactar direta ou indiretamente o hipocampo ^{50,98}, e indica que além de suas funções cognitivas ²⁵ também participa do controle de alimentação. É reconhecido que o controle da ingestão de alimento depende da habilidade em codificar e representar na memória uma variedade de informações sobre suas experiências com os alimentos ⁴⁰. Em

roedores induzidos à obesidade pela dieta rica em gordura, foi constatado prejuízo nos processos de aprendizagem relacionados a essa estrutura ²⁵.

A produção alterada de citocinas provenientes das dietas nos tecidos periféricos é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e chegar até estruturas neurais. Estas, dentre suas funções, influenciam as vias envolvidas na cognição, incluindo o metabolismo de neurotransmissores, funções neuroendócrinas e a plasticidade neural ^{71,99}, indicando que a obesidade está vinculada à fragilidade cerebral e aos distúrbios cognitivos ^{23,44,99}.

Acredita-se que os efeitos da obesidade podem colaborar para um grau maior de déficits cognitivos em relação a indivíduos sem essa doença, e também sugere que a obesidade está associada à atrofia cerebral ¹⁰⁰. O declínio cognitivo no envelhecimento é normalmente atribuído a essa atrofia cerebral e há cada vez mais evidências de que esse processo é influenciado por disfunções metabólicas ⁹⁶. Embora existam razões biológicas associando a gordura corporal com a função cognitiva, também há evidência de que um maior IMC está associado com doenças crônicas que aumentam o risco de demências ^{101,102}. No entanto, há necessidade de mais estudos que avaliem os mecanismos biológicos do efeito da dieta sobre a função cerebral a fim de entender melhor os processos de memória e os parâmetros neuroquímicos envolvidos.

1.1.2.1 Sistema colinérgico

A liberação de neurotransmissores é o primeiro passo para a formação da memória ⁹⁰. O sistema colinérgico desempenha um papel crucial na aprendizagem e memória ¹⁰³ e um dos neurotransmissores mais estudados nesse caso é a acetilcolina (ACh) ¹⁰⁴. A ACh é um dos neurotransmissores do SNC e sistema nervoso periférico, a qual é formada durante o processo de respiração celular e a formação de colina, considerado um importante produto do metabolismo de lipídios. Sua importância se dá, fundamentalmente, nas funções desempenhadas pelo SNC, sendo associadas com as funções cognitivas, processamento de informações sensoriais, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral ^{95,105}.

Esse neurotransmissor tem efeitos principalmente excitatórios e são mediados por vários subtipos de receptores nicotínicos e muscarínicos, sendo que

deste último, alguns são inibitórios ¹⁰⁶. A ACh encontra-se alojada em vesículas nas terminações nervosas e quando há despolarização do neurônio colinérgico, essas vesículas são liberadas nas extremidades dos neurônios e a ACh liberada entra na sinapse podendo ligar-se a um receptor ou ser degradada ²².

A AChE é uma serina hidrolase que desempenha papel essencial no mecanismo colinérgico. É uma enzima que catalisa a hidrólise da ACh na transmissão do impulso nervoso na sinapse colinérgica entre neurônios ¹⁰⁷. A enzima está ligada à membrana basal entre as membranas pré e pós-sinápticas desempenhando seu papel fisiológico ^{106,107}, e acontece conforme figura 3.

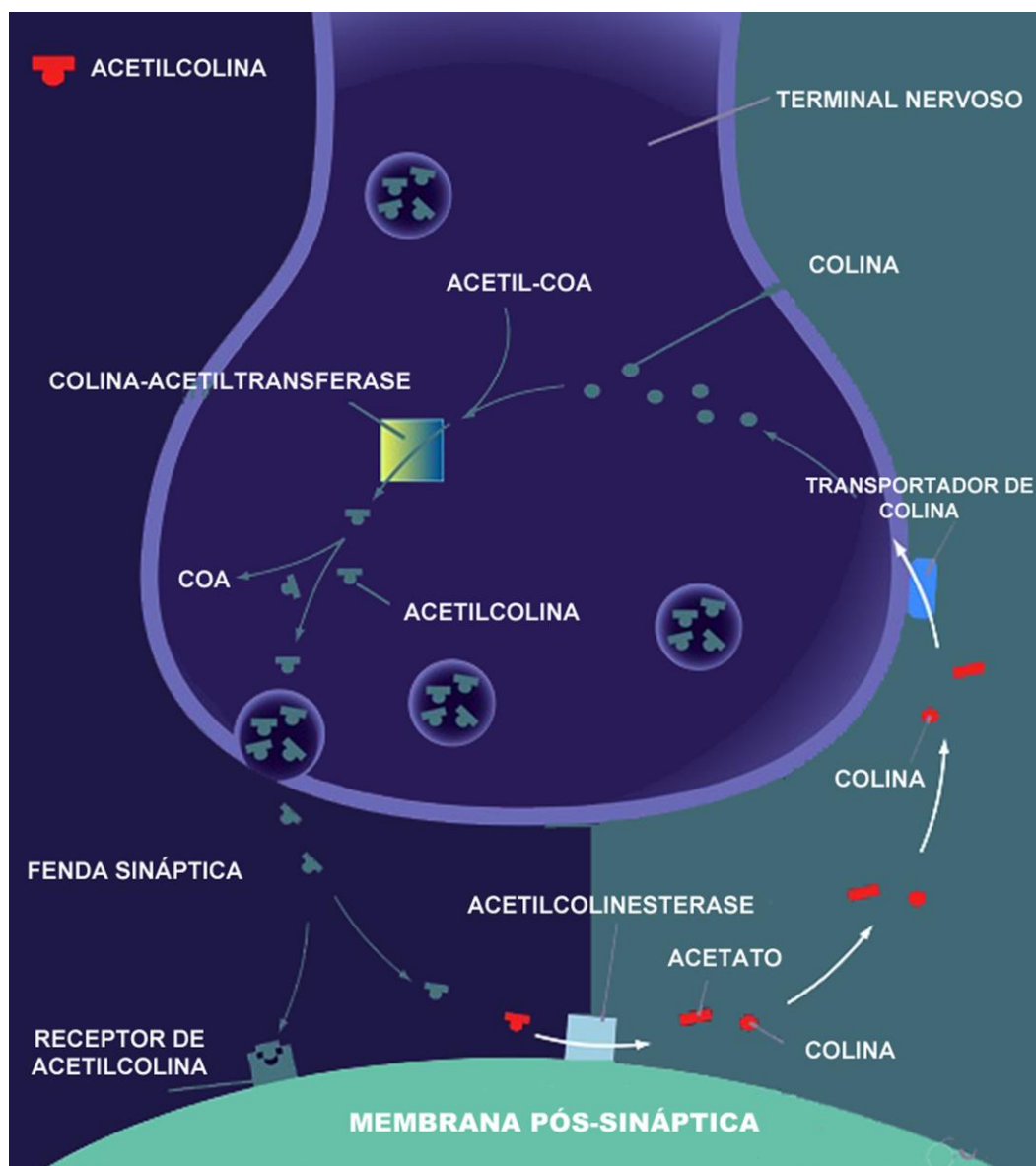


Figura 3 – Eventos do sistema colinérgico entre neurônios pré e pós-sinápticos representando a degradação da ACh pela AChE.

Fonte: Adaptado de CNSforum, 2014 ¹⁰⁸.

As funções neuromoduladoras da AChE afetam o crescimento de neuritos e a sinaptogênese e desempenham um papel importante na formação de memórias^{21,107}. Esta enzima é amplamente expressa em tecidos que recebem inervação colinérgica, tais como neurônios, células do músculo, células do sistema nervoso autônomo e do sistema nervoso imune. A atividade desta enzima também pode ser encontrada em regiões do cérebro com baixa ou nenhuma relação colinérgica, tais como a substância negra, o cerebelo e o hipotálamo e em tecidos desconhecidos de inervação colinérgica²¹. Poucos estudos discutem a relação dessa enzima com obesidade, porém é considerada de grande importância, como sendo fundamental no bom funcionamento do SNC, e vem sendo associada ao desenvolvimento cerebral, aprendizagem, formação de memória e dano neural^{21,107}.

1.1.2.2 Cadeia respiratória mitocondrial

Os neurônios são altamente dependentes de adenosina trifosfato (ATP do inglês *adenosine triphosphate*) para realizar suas funções fisiológicas¹⁰⁹. O Ca^{2+} (cálcio) intracelular, regulado pelas mitocôndrias, é muito importante para a geração de potenciais de ação em processos de sinalização, transmissão sináptica, dinâmica do citoesqueleto e regulação da expressão gênica¹¹⁰.

Nesse sentido, as mitocôndrias desempenham um papel central na homeostase energética. A mitocôndria é uma organela intracelular existente na maioria das células eucarióticas, desempenhando um importante papel na produção de ATP celular, e está envolvida na homeostasia celular, tendo um importante papel na sinalização intracelular, apoptose, metabolismo de aminoácidos, lipídios, colesterol, esteróides e nucleotídeos. Contudo, a sua principal função é no metabolismo energético em uma via final comum de produção de ATP, por meio de respiração celular^{109,111}.

Nesse processo, moléculas ricas em energia, como a glicose, provenientes da alimentação, são metabolizadas por uma série de reações de oxidação, levando à produção de gás carbônico (CO_2) e de água (H_2O). Os intermediários dessas reações doam elétrons a coenzimas específicas – nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD^+) e flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) – formando as coenzimas reduzidas ricas em energia, NADH e FADH_2 . Cada uma

dessas coenzimas reduzidas por sua vez, podem doar um par de elétrons a um grupo especializado no seu transporte, denominado de cadeia transportadora de elétrons ¹⁰⁹. Interrupções na homeostase mitocondrial está intimamente associada com estados de doença, provocadas por alterações na função dos tecidos ou por prejuízos, mais evidentes nos tecidos com maior exigência metabólica ¹¹².

Os componentes da cadeia respiratória localizam-se na membrana interna da mitocôndria, compreendem quatro complexos enzimáticos (complexo I, II, III e IV). A medida que os elétrons fluem através da cadeia transportadora eles perdem parte de sua energia livre. Parte dessa energia pode ser captada e armazenada para a produção de ATP através de uma molécula de ADP (Adenosina Difosfato) e de Pi (Fosfato Inorgânico). A parte resultante da energia livre, que não é captada para a síntese de ATP, é utilizada para impulsionar outras reações ¹⁰⁹, conforme figura 4.

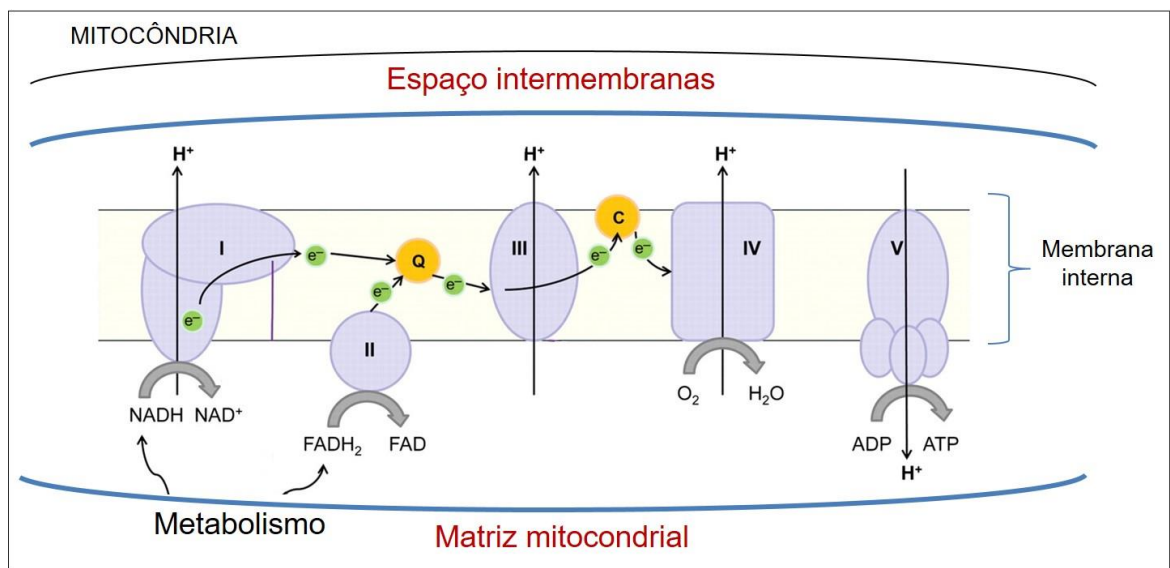


Figura 4 - Cadeia transportadora de elétrons até a produção final de ATP.

Fonte: Adaptado de Yu e Benett, 2014 ¹¹³.

Além da cadeia respiratória, existe uma outra fonte de produção de ATP, pela enzima creatina quinase (CK do inglês *creatine kinase*), que está envolvida na estocagem de fosfatos de alta energia produzidos pela mitocôndria, ou seja, catalisa a transferência reversível do grupo N-fosforil da fosfocreatina para ADP, regenerando o ATP ¹¹⁴, como representado na figura 5. Há estudos que indicam que a atividade desta enzima esteja alterada em diversas doenças ^{114,115}.

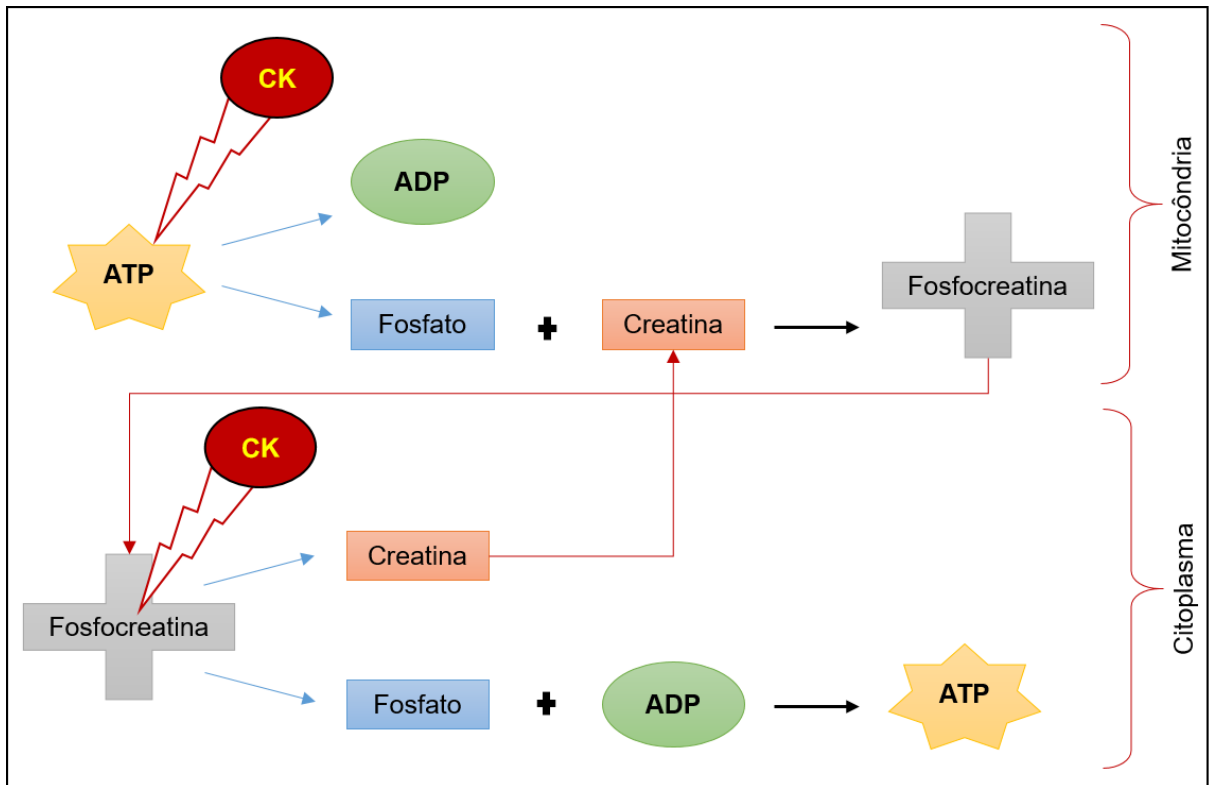


Figura 5 - Fonte alternativa de ATP através da ação da enzima CK.

Recente estudo tem revelado que as mitocôndrias desempenham papel importante dentro de populações neuronais que estão envolvidas na regulação central do equilíbrio energético, podendo estar relacionadas com a regulação do balanço energético e na etiologia da obesidade ¹¹⁶. Ainda, pesquisas levantam a hipótese de que defeitos na atividade mitocondrial podem desempenhar papel relevante na etiologia da Diabetes *Mellitus* tipo 2, pela resistência à insulina, porém a relação entre os dois ainda é controversa ^{117,118}.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros de memória em modelo animal de obesidade induzido por dieta hiperlipídica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar peso corporal e gordura visceral mesentérica em modelo animal de obesidade induzido por dieta hiperlipídica;
- Analisar a memória de reconhecimento de objetos de curta e longa duração em modelo animal de obesidade induzido por dieta hiperlipídica;
- Avaliar a memória aversiva em modelo animal de obesidade induzido por dieta hiperlipídica;
- Verificar a atividade da AChE no hipocampo e córtex pré-frontal em modelo animal de obesidade induzido por dieta hiperlipídica;
- Avaliar a atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo e córtex pré-frontal em modelo animal de obesidade induzido por dieta hiperlipídica;
- Avaliar a atividade da CK no hipocampo e córtex pré-frontal em modelo animal de obesidade induzido por dieta hiperlipídica.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

O delineamento do estudo proposto é do tipo experimental com randomização.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, machos (30-40g), com aproximadamente 40 dias de idade no início do experimento, obtendo-se os exemplares do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais tiveram livre acesso à comida e água, sendo mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura entre $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Foram divididos em 2 grupos, que inclui 30 animais por grupo, totalizando 60 animais para o experimento, alojados em caixas individuais.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram pesados e randomizados em 2 grupos de igual número: um grupo controle, que recebeu dieta normolipídica e um grupo induzido à obesidade por dieta hiperlipídica, denominado grupo obeso.

A partir da divisão dos grupos se iniciou o protocolo de dieta para indução da obesidade por 10 semanas. Após o término deste período, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de reconhecimento de objetos e esquia inibitória. Logo após os testes de comportamento, o modelo de obesidade foi validado nos animais, através da mensuração do peso corporal e da gordura visceral, que ocorreu após a morte, em seguida as estruturas cerebrais foram isoladas. Os animais submetidos ao teste de esquia inibitória foram descartados após a morte, afim de não comprometer as análises bioquímicas. O desenho experimental está descrito na Figura 6.

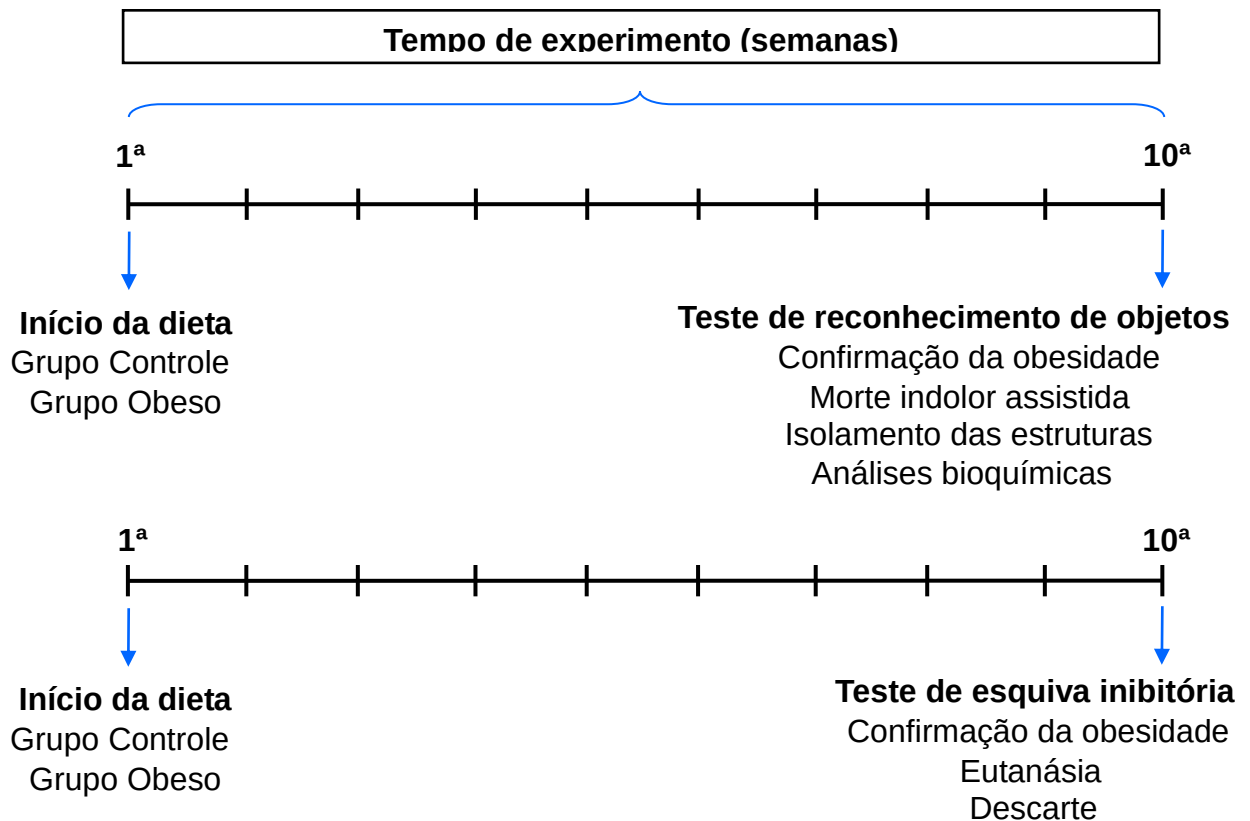


Figura 6 – Desenho experimental representado pela sequência de eventos diferenciando os dois processos de testes comportamentais.

3.3.1 Modelo animal de obesidade

Inicialmente os animais foram pesados, e logo após pareados em dois grupos: um grupo controle (n=30), que recebeu dieta normolipídica; e um grupo obeso (n=30), que recebeu dieta hiperlipídica. O protocolo para indução da obesidade e a composição das dietas foram baseados em estudos prévios ^{16,57}. A ração oferecida aos animais foi comprada de empresa especializada em desenvolvimento e produção de dietas padronizadas para experimentação animal (PragSoluções Biociências).

A dieta hiperlipídica forneceu mais calorias e teve maior percentual de gordura saturada que a dieta normolipídica. A composição e o valor calórico das dietas foi baseada em estudo prévio conduzido por Cintra e colaboradores ⁵⁷ e descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Composição das dietas e valor calórico a cada 1000g (1KG) de ração.

Componentes	Dieta normolipídica		Dieta hiperlipídica	
	g/Kg	Kcal/Kg	g/Kg	Kcal/Kg
Amido de milho	427,5	1710	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	132	528	132	528
Amido dextrinizado	100	400	100	400
Óleo de soja	40	360	40	360
Banha de porco	0	-	312	2808
Celulose	50	-	50	-
Mistura de minerais	35	-	35	-
Mistura de vitaminas	10	-	10	-
L Cistina	3	-	3	-
Bitartarato de colina	2,5	-	2,5	-
Butil hidroxitolueno	0,028	-	0,028	-
Total	1000,028	3798	1000,028	5.358

Fonte: Adaptado de Cintra e colaboradores ⁵⁷.

3.3.1.1 Confirmação da obesidade

Para confirmar a indução da obesidade nos camundongos pela dieta hiperlipídica, após 10 semanas de protocolo de dieta, foram aferidos novamente o peso corporal dos camundongos, realizadas em comparação com os mesmos parâmetros do grupo controle. Após se obter esse parâmetro, os animais foram mortos por método de decapitação. Depois, a cavidade abdominal dos animais foi aberta e o tecido adiposo da região mesentérica foi retirado, lavado e pesado em balança de alta precisão. Os resultados da massa de tecido adiposo extraído foram expressos como gramas de gordura. A gordura visceral foi mensurada, conforme previamente descrito por Hansen e colaboradores ¹¹⁹.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos é utilizado para o estudo da memória declarativa em animais experimentais. Esse teste seguiu um protocolo que utilizou um aparato semelhante a uma caixa, cujo tamanho é específico para camundongos. Esta tarefa baseou-se na tendência dos camundongos a preferir a exploração de um objeto novo em comparação com objetos familiares ²⁵, e seguiu as

orientações de estudos prévios ^{120,121}. Este teste foi constituído de 4 etapas: habituação, treino, teste de MCD, teste de MLD.

Primeiramente os animais foram habituados ao aparato em um dia, para familiarização com ambiente a fim de minimizar condições de ansiedade e de estresse. Nesse processo, os animais (n=10), tiveram livre acesso a caixa por 5 minutos individualmente, para exploração do ambiente na ausência de objetos. Um dia depois, após habituação, os animais foram submetidos à seção de treino, onde foram colocados na arena dois objetos idênticos (A e B) para livre exploração por 5 minutos.

A fase de teste de MCD foi realizada 1 hora e 30 minutos depois do treino, onde um dos objetos é substituído por um outro (A e C), de formas e texturas diferentes, podendo o animal explorar o aparato por 5 minutos. A etapa de teste de MLD foi realizada 24 horas após a seção de treino, onde o objeto C foi substituído por um outro D (A e D), e o animal obteve um tempo de exploração de 5 minutos. As posições dos objetos (familiar e novo) foram randomizadas e a arena foi limpa entre os testes.

Em todas as etapas, o tempo gasto pelo animal explorando cada objeto (A, B, C e D) foi marcado por um observador. A exploração do objeto foi definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz e/ou as patas dianteiras. Não foi considerado como comportamento exploratório o ato de sentar ou andar em torno do objeto.

Os resultados foram expressos em percentual do total de tempo de exploração computado em segundos, permitindo determinar o índice de reconhecimento de objetos a partir da proporção de tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto familiar ($t_{novo}/t_{novo} + t_{familiar}$).

3.4.2 Esquiva Inibitória

Consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal (1mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1 cm. Uma plataforma medindo 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento foi colocada junto à parede esquerda do aparelho. Esse protocolo foi realizado em duas etapas: treino e teste de memória, sendo que o animal é submetido a cada etapa apenas uma vez.

Na sessão de treino, os animais dos dois grupos (n=10) foram colocados sobre a plataforma e mediu-se a latência, considerada o tempo que o animal leva para descer com as quatro patas da plataforma. Imediatamente após descer da plataforma (com as 4 patas), o animal recebeu um choque de 0,2 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e mediu-se o tempo (em segundos) que ele leva para descer (latência), porém não é gerado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. O intervalo entre o treino e o teste é de 24 horas. Nas sessões de teste, o tempo de latência ao teste de esQUIVA INIBITÓRIA (máximo de 180 segundos de permanência) foi utilizado como uma medida de retenção da esQUIVA INIBITÓRIA.

O modelo de esQUIVA INIBITÓRIA é um dos mais utilizados em relação a testes de memória e aprendizado caracterizando uma memória aversiva e foi baseada em estudos prévios ^{78,93,122}. Esse grupo de animais submetidos a tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA não foi utilizado para outros testes devido a possíveis alterações nas estruturas neurais que possam ser causadas pela corrente elétrica.

3.5 REMOÇÃO E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

Após a morte dos animais, o crânio foi aberto e o tecido cerebral rapidamente removido. Hipocampo e córtex pré-frontal foram isolados, homogeneizados e centrifugados. O sobrenadante foi armazenado a -80°C para ser utilizado nas análises bioquímicas.

3.6 ATIVIDADE DE AChE

A atividade da enzima AChE foi realizada de acordo com o método descrito por Ellman e colaboradores ¹²³. As amostras foram avaliadas em duplicata. Como controle, as proteínas foram mensuradas pelo método de Lowry e colaboradores ¹²⁴ utilizando soro albumina bovina como padrão. A hidrólise da acetilcolina foi avaliada em uma concentração de 0,8mM de iodeto de AChE (AcSCh) em 1mL de uma solução contendo tampão fosfato 100mM (pH 7,5) e ácido ditionitrobenzóico (DTNB) 1,0mM. Foi adicionado à solução 50µL de amostra à solução e pré-incubadas por 3 minutos. A hidrólise foi monitorada pela formação do diânion tiolato de DTNB a 412nm por 2-3 minutos em intervalos de 30 segundos

para uma temperatura de 25°C. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de AcSCh.h}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$.

3.7 ATIVIDADE DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

As alíquotas das estruturas hipocampo e córtex pré-frontal foram primeiramente homogeneizadas (1:19w/v) em tampão SETH (250mM sacarose, 2mM ácido etilenodiamino tetra-acético, 10mM *Trizma* base, 50IU/mL heparina), pH 7,4 e centrifugado a 3000 rotações por minuto por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado a -80°C. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores ¹²⁴, e albumina sérica bovina utilizada como padrão.

A atividade do complexo I foi avaliada nas estruturas conforme descrito por Cassina e Radi ¹²⁵ pela taxa de NADH-dependente da redução do ferrocianeto a 420nm durante 3 minutos. A atividade do complexo II avaliada pela diminuição da absorbância causada pela redução do DCIP a 600nm em espectrofotômetro durante 5 minutos, conforme adotado por Fischer e colaboradores ¹²⁶. A técnica para dosagem do complexo IV seguiu conforme Rustin e colaboradores ¹²⁷, através do decréscimo na absorbância devido à oxidação de citocromo C previamente reduzido. As leituras foram feitas a 550nm durante 10 minutos. Os resultados foram expressos em nmol-min/mg-proteína.

3.8 ATIVIDADE DA CREATINA QUINASE

O meio de incubação para dosagem da creatina quinase foi composto por fosfocreatina e adenosina difosfato (ADP). A formação de creatina foi medida por um método colorimétrico em espectrofotômetro a 540nm como descrito por Hughes ¹²⁸. Os resultados expressos em nmol-min/mg de proteína.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística e os gráficos foram realizados através do programa estatístico *GraphPad Prism 6*. Os dados bioquímicos foram avaliados pelo teste *t student*, comparando dois grupos. Os dados referentes às tarefas de reconhecimento de objetos e esquia inibitória foram analisados por meio de *Mann-*

Whitney para múltiplas comparações, e as comparações dentro do grupo foram feitas utilizando-se o teste de *Wilcoxon*. Em todos as análises a significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.10 ASPECTOS ÉTICOS

Os experimentos foram realizados após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL, cuja aprovação de registro é 15.003.4.01.IV (Anexo A) e 15.005.4.01.IV (Anexo B), e seguiu os princípios de cuidado e manejo ético descritos na Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) de 2013 ¹²⁹.

4. RESULTADOS

A avaliação do peso corporal dos animais que foi realizada semanalmente, mostra aumento significativo de peso no grupo obeso quando comparado aos animais do grupo controle. A diferença entre os grupos se mostrou significativa após 3 semanas de indução da obesidade, e se estendeu até o final do experimento como demonstrado na figura 7.

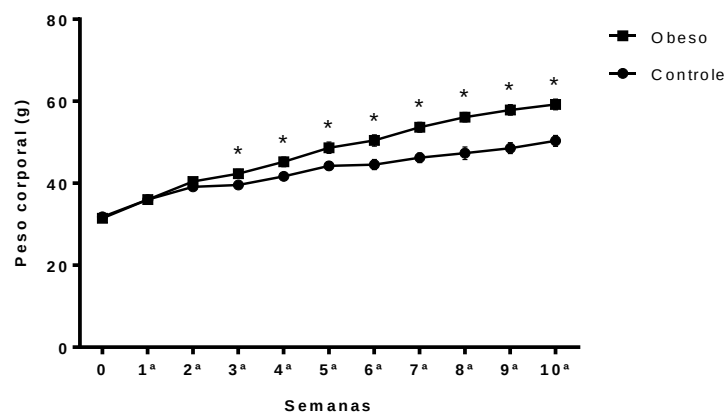


Figura 7 - Avaliação do peso corporal. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, $n=9$ para os dois grupos. *Diferença significativa entre grupo controle e obeso $p<0,05$ (Teste t).

A avaliação do peso da gordura mesentérica foi significativa nos animais do grupo obeso em comparação com os animais do grupo controle (figura 8).

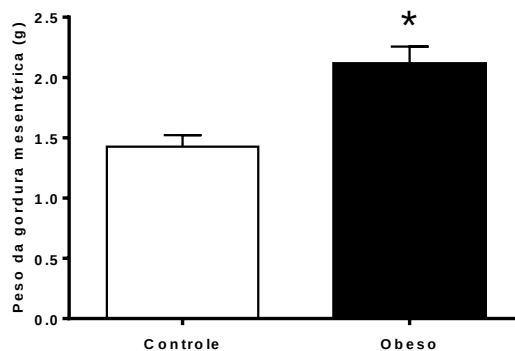


Figura 8 - Avaliação da gordura visceral da região mesentérica. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, $n=9$ para os dois grupos. *Diferença significativa entre grupo controle e obeso $p<0,05$ (Teste t).

No teste de reconhecimento de objetos, na figura 9A, a análise mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa sobre a MCD entre os animais do grupo controle e os obesos, o que indica que os dois grupos exploraram igualmente o objeto familiar e o novo. Na figura 9B também não houve diferença na MLD sobre a exploração de objetos dos animais obesos em comparação com os animais controle.

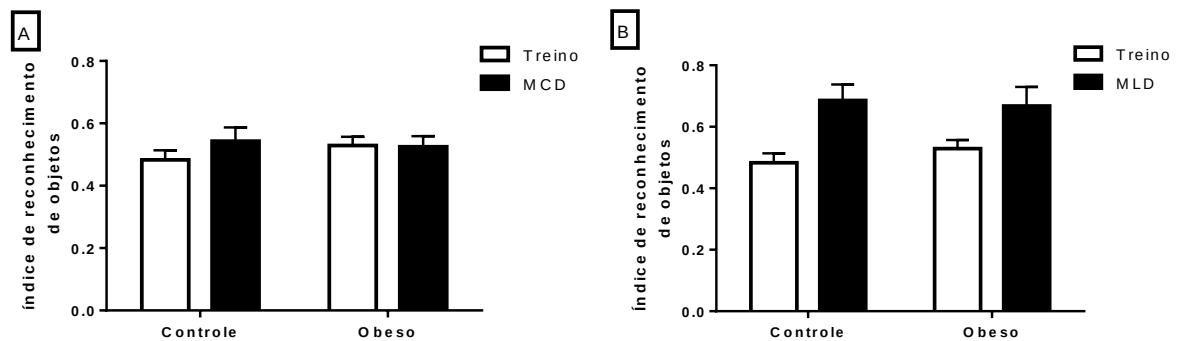


Figura 9 - Avaliação da memória de reconhecimento de objetos. (A) A MCD foi avaliada 1,5h após o treino. (B) A MLD foi avaliada 24 horas após o treino. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro padrão ($n=10$). Não houve diferença significativa quando comparado o grupo obeso com o grupo controle.

Dados sobre a memória aversiva, mostraram diferença significativa quando comparado o teste de memória em relação ao treino do próprio grupo. No entanto, na comparação entre os dois grupos, controle e obeso, não houve diferença significativa, considerando que ambos os grupos obtiveram praticamente a mesma latência para descer da plataforma não havendo prejuízos de memória, figura 10.

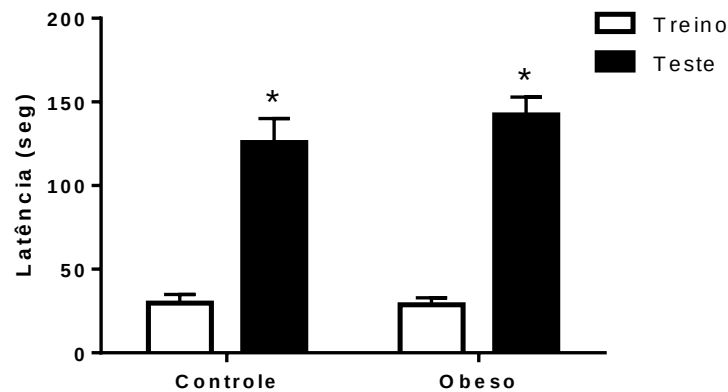


Figura 10 - Avaliação da memória aversiva. Resultados apresentados como a média $\pm$ erro padrão, $n=10$ por grupo. Teste avaliado 24 horas após o treino. *Diferença significativa $p<0,05$ vs treino do seu respectivo grupo (*Wilcoxon*). Não houve diferença significativa quando comparado o grupo obeso com o grupo controle.

Os resultados da atividade de AChE no hipocampo e córtex pré-frontal não se mostraram significativos quando comparado o grupo controle com o grupo obeso, demonstrado na figura 11.

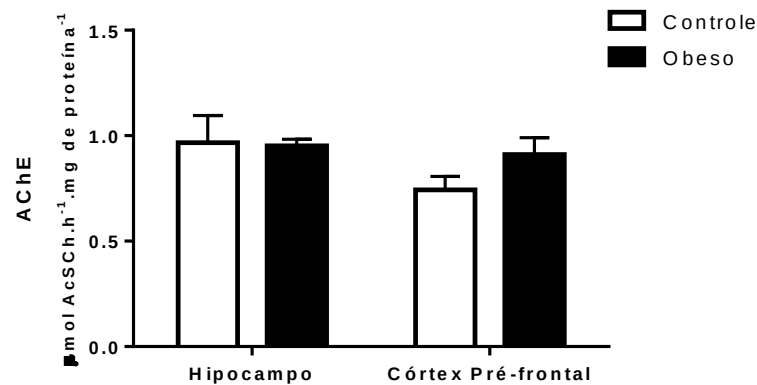


Figura 11 - Avaliação da atividade da AChE no hipocampo e córtex pré-frontal. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, $n=10$ para os dois grupos. Não houve diferença significativa entre grupo controle e obeso (Teste *t*).

Nossos resultados mostraram (figura 12) que a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial foi inibida no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais obesos comparando com os animais controle.

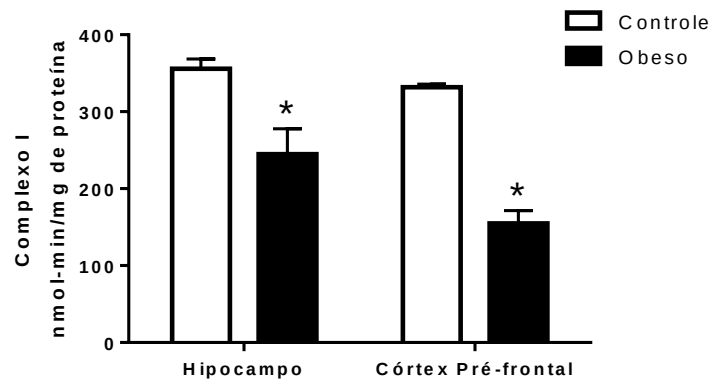


Figura 12 - Avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo e córtex pré-frontal. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, $n=10$ para os dois grupos. *Diferença significativa entre grupo controle e obeso $p<0,05$ (Teste t).

A atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial se mostrou inibida no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais obesos quando comparada aos controles, conforme figura 13.

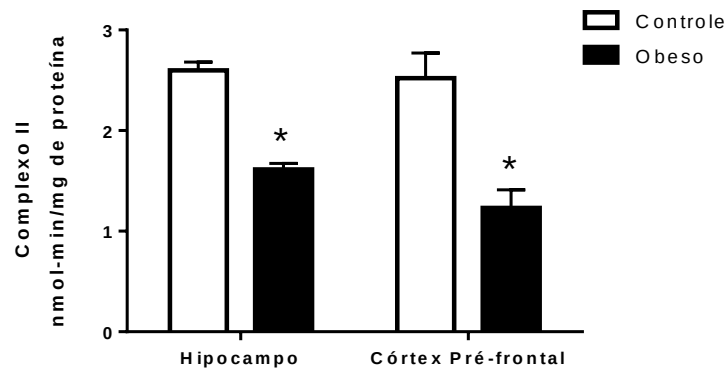


Figura 13 - Avaliação do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo e córtex pré-frontal. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, $n=10$ para os dois grupos. *Diferença significativa entre grupo controle e obeso $p<0,05$ (Teste t).

A atividade do complexo IV foi inibida no hipocampo e córtex pré-frontal de animais obesos quando comparado com o controle conforme figura 14.

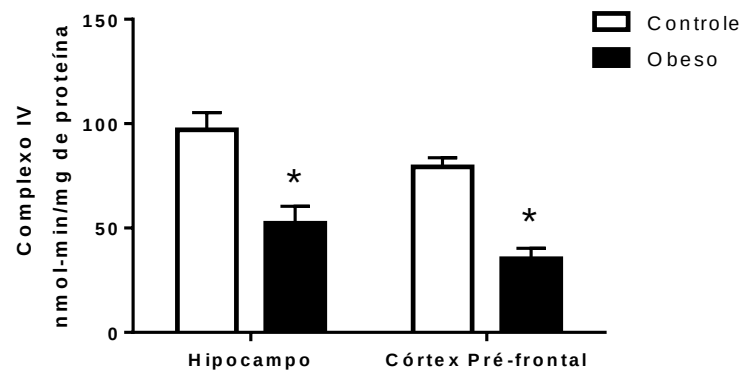


Figura 14 - Avaliação do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo e córtex pré-frontal. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, $n=10$ para os dois grupos. *Diferença significativa entre grupo controle e obeso $p<0,05$ (Teste t).

Os resultados da atividade da CK, como fonte alternativa na geração de ATP foi inibida tanto no hipocampo como no córtex pré-frontal dos animais obesos em comparação com o grupo controle (figura 15).

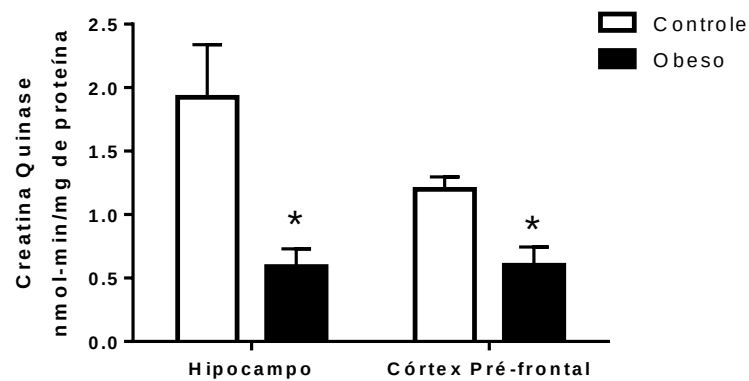


Figura 15: Avaliação da CK no hipocampo e córtex pré-frontal. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, $n=10$ para os dois grupos. *Diferença significativa entre grupo controle e obeso $p<0,05$ (Teste t).

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho pode-se observar que os animais alimentados com a dieta hiperlipídica obtiveram aumento significativo de peso corporal e gordura mesentérica quando comparados aos animais do grupo controle, os quais foram alimentados com dieta normolipídica. A obesidade, considerada um desafio para a saúde pública atualmente, surge principalmente devido ao excesso de alimentos altamente energéticos, especialmente os ricos em gordura ^{23,25}.

Estes resultados se somam a estudos anteriores no que se refere ao modelo de indução de obesidade, onde uma dieta hiperlipídica é suficiente para causar obesidade com o aumento de peso em animais experimentais ^{16,57} bem como aumento do volume de gordura visceral ¹¹⁹. Mesmo variando o percentual de gordura, as dietas hiperlipídicas são indutoras de obesidade em outros estudos ^{34,97,130}.

Pesquisas realizadas atualmente vêm demonstrando comprometimento de memória em modelos animais de obesidade, através de diferentes testes comportamentais ^{34,130,131}. Porém, os resultados deste estudo mostraram que a exposição à dieta hiperlipídica por 10 semanas não foi capaz de causar prejuízos na memória de reconhecimento de objetos de curta e longa duração, assim como na memória aversiva de camundongos. A análise da memória aversiva por esQUIVA inibitória na obesidade é pouco descrita na literatura, mas outros estudos avaliam memórias semelhantes utilizando metodologias diferentes, com tarefas aversivas condicionadas ao olfato e audição ^{132,133}.

Corroborando aos resultados deste estudo foram os de Kosari e colaboradores ⁹⁷ que utilizaram ratos Long Evans e não encontraram memória prejudicada na tarefa de reconhecimento de objetos em animais expostos à dieta rica em gordura por 12 semanas. Camundongos C57BL/6 do estudo de Heyward e colaboradores ¹³⁴, induziram a obesidade por dieta durante 23 semanas, e mostraram memória intacta nesta mesma tarefa 24 horas após a fase de treino, no entanto, prejuízo foi observado na tarefa de localização de objetos, caracterizada por ser uma memória espacial.

Em estudo realizado por Jurdak e Kanarek ¹³⁵ foi avaliado a memória de reconhecimento de objetos em ratos induzidos à obesidade por duas dietas distintas,

uma dieta rica em gordura e outra dieta rica em sacarose, e constatou-se que ratos mantidos com uma dieta rica em sacarose apresentaram memória de reconhecimento de objetos prejudicada, uma vez que os animais mantidos numa dieta hiperlipídica apresentaram memória intacta na mesma tarefa.

Diferenças entre nossos resultados e os encontrados na literatura podem ocorrer por diversos motivos. Uma possibilidade para essas disparidades é que dietas compostas de macronutrientes distintos possam influenciar as tarefas dependentes do hipocampo e áreas relacionadas em graus diferentes, uma vez que dietas ricas em açúcares podem comprometer os tecidos pela resistência à insulina⁷¹.

A maioria dos estudos que constataam déficit no comportamento avaliaram memória espacial através de Labirinto Aquático de Morris, de localização de objetos, entre outros^{34,134,136,137}. Nesse sentido, é possível que a ingestão de gordura ou os componentes das dietas afete diferentemente as tarefas de memória espacial e as não espaciais, como as apresentadas neste trabalho. Ainda, os animais utilizados no experimento, a idade, o tempo de indução à obesidade, podem ser fatores contribuintes para essas diferenças, visto que seguem protocolos diferentes.

A enzima AChE responsável pela degradação da ACh, é um componente fundamental da sinalização colinérgica^{21,138,139}. No entanto, apesar de sua importância para a manutenção e modulação da memória^{139,140} a atividade desta enzima não foi alterada no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais obesos, o que complementa e apoia os resultados dos testes comportamentais na avaliação da memória.

A relação entre essa enzima e a obesidade ainda é pouco descrita na literatura, mas sabe-se que possui forte relação no processamento da informação espacial¹³⁹. Corroboram com nossos achados Kosari e colaboradores⁹⁷, que não encontraram diferença na atividade desta enzima nos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas em regiões específicas como CA1, CA2 e 3, e giro dentado no hipocampo. Essa semelhança indica que protocolos de indução semelhantes, com 10 ou 12 semanas não são suficientes para causar prejuízos no sistema colinérgico.

Mesmo sua função como um marcador de possíveis danos entre transmissões sinápticas não terem sido constatadas em animais obesos, pesquisas indicam que sua ação no SNC vai além do término da transmissão sináptica,

podendo funcionar como neuromodulador, mudando o estado de um conjunto de neurônios em resposta à mudanças das condições ambientais ¹⁴¹, afetando o desenvolvimento de neuritos e sinaptogêneses que também desempenham papel importante em relação à formação de memórias ^{21,138}.

Em contrapartida aos achados relacionados a comportamento e atividade de AChE, houve inibição dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, bem como da atividade da CK nas estruturas responsáveis pela memória em animais obesos. Assim como todas as células, os neurônios utilizam de ATP como fonte de energia fundamental para realização de suas funções ¹⁴². As mitocôndrias, são essenciais para a função neuronal e desempenham seu papel principal na produção e manutenção dos níveis de ATP ¹⁰⁹.

Através de complexos da cadeia respiratória mitocondrial, essas organelas permitem a oxidação de NADH e FADH₂, provenientes de outras vias metabólicas, e o transporte de equivalentes reduzidos ao longo de uma série de transportadores para o aceitador final, o oxigênio, e impulsionam prótons para o espaço intermembranas, criando uma diferença de potencial eletroquímico, utilizado na formação de ATP ¹⁰⁹. Estudos anteriores relatam que na obesidade a cadeia respiratória pode estar prejudicada, estando em conformidade com os achados deste experimento ^{20,142}.

Devido sua capacidade glicolítica, as mitocôndrias são altamente dependentes da fosforilação oxidativa (FOX) para as suas necessidades energéticas ¹⁴². A FOX na produção de energia, é uma importante fonte de radicais livres, incluindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), hidroxila (HO[•]) e superóxido (O₂^{•-}), que são também produtos da respiração celular normal. O metabolismo oxidativo no cérebro produz grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são controladas por mecanismos antioxidantes, por enzimas como superóxido dismutase e catalase ¹⁴³.

No entanto, a inibição de complexos da cadeia respiratória mitocondrial pode levar a um aumento na produção de ERRO ¹¹², podendo inclusive estar relacionada com a fisiologia do envelhecimento e a fisiopatologia de algumas doenças como a Doença de Alzheimer e Parkinson ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Além disso, Freeman e colaboradores ⁵², avaliaram estresse oxidativo em córtex e hipocampo de animais induzidos a obesidade por dieta hiperlipídica e constataram níveis elevados de ERO e disfunção cognitiva nesses animais.

Ainda que as ERO sejam mediadores fisiológicos importantes na plasticidade, sinalização e presentes no metabolismo de células normais, acumuladas em excesso nesses tecidos podem se tornar prejudicial para suas funções ^{142,142}. Inclusive, alterações nas funções mitocondriais vêm sendo apontadas como precursores de doenças neurodegenerativas em alguns estudos ^{145,147,148}.

Nesse sentido, os substratos energéticos em excesso poderiam resultar em aumento da produção de ERO, que por sua vez tem consequências significativas na função mitocondrial e no metabolismo energético e, por outro lado, o próprio excesso de ERO poderia comprometer ainda mais a função mitocondrial, na sua capacidade de atender à demanda de energia celular, levando à produção de mais ERO, processos que podem interferir na cadeia respiratória mitocondrial e consequentemente na produção de ATP ¹⁴², sustentada pela inibição da atividade da CK, cuja relação com a obesidade não havia sido avaliada na literatura é o momento, falhando na sua função como fonte alternativa de energia nos tecidos apresentados ¹⁰⁷,

Acredita-se que havendo uma disfunção com relação à cadeia respiratória mitocondrial e CK, os níveis de ATP possam estar diminuídos nesses tecidos, no entanto, é possível que os mecanismos que levaram a inibição de complexos da cadeia respiratória mitocondrial na obesidade sejam distintos dos mecanismos que relacionam a AChE e memória. Desta forma, a partir dos resultados obtidos neste estudo e evidências da literatura sugere-se que a obesidade está associada à disfunção mitocondrial, no entanto, a relação com os processos de memória ainda precisa ser investigada. Considerando que as taxas de obesidade vêm aumentando em todo o mundo, e o risco de desenvolver outras comorbidades associadas, preocupações devem ser levantadas em relação a esta doença e o bom funcionamento do SNC.

6. CONCLUSÃO

A partir destes resultados pode-se concluir que animais induzidos a obesidade por dieta hiperlipídica não apresentaram danos na memória de reconhecimento de objetos de curta e longa duração e memória aversiva, nem na atividade da enzima AChE responsável pelos processos de memória. No entanto, hipocampo e córtex pré-frontal são susceptíveis à disfunção mitocondrial em relação à cadeia respiratória mitocondrial que se mostrou prejudicada nos animais obesos. Nesse sentido, os dados sugerem que a produção ATP pode estar prejudicada nestas estruturas, porém não foi suficiente para causar danos nos outros testes de avaliação de memória neste estudo. Mais estudos precisam ser realizados com o objetivo de aprimorar a relação da disfunção mitocondrial com obesidade e sua associação com prejuízos de memória.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Obesity and overweight [internet]. 2015 Jan [acesso em 29 maio 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
2. Mattes R. Energy intake and obesity: Ingestive frequency outweighs portion size. *Physiol & Behav.* 2013;134:110–18.
3. Mattes R. Eating patterns, diet quality and energy balance: An introduction to an international conference. *Physiol & Behav.* 2014;134:1-4.
4. World Health Organization. World Health Statistics 2012 [internet] 2012 [acesso em 10 Nov 2015]. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44844/1/9789241564441_eng.pdf?ua=1
5. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
6. Knight JA. Diseases and disorders associated with excess body weight. *Ann Clin Lab Sci.* 2011;41(2):107-21.
7. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology.* 2005;146(10):4192-99.
8. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci.* 2009;29(2):359-70.
9. Francis H, Stevenson R. The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain. *Appetite.* 2013;63:119–28.
10. Shefer G, Marcus Y, Stern N. Is obesity a brain disease? *Neurosci Biobehav Rev.* 2013;37:2489-03.
11. Nummenmaa L, Hirvonen J, Hannukainen JC, Immonen H, Lindroos MM, Salminen P, et al. Dorsal striatum and its limbic connectivity mediate abnormal anticipatory reward processing in obesity. *PLoS One.* 2012;7(2):e31089.
12. Miller AA, Spencer SJ. Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun.* 2014;42:10-21.

13. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;316(2):129-39.
14. Johnson AR, Milner JJ, Makowski L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev.* 2012;249(1):218-38.
15. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012;122(1):153-62.
16. Farias JM, Bom KF, Tromm CB, Luciano TF, Marques SO, Tuon T, et al. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. *Horm Metab Res.* 2013;45(3):190-6.
17. Barouch LA, Gao D, Chen L, Miller KL, Xu W, Phan AC, et al. Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity. *Circ Res.* 2006;98(1):119-24.
18. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2011;164(6):899-04.
19. Crowe S, Turpin SM, Ke F, Kemp BE, Watt MJ. Metabolic remodeling in adipocytes promotes ciliary neurotrophic factor-mediated fat loss in obesity. *Endocrinology.* 2008;149(5):2546-56.
20. Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005;54(1):8-14.
21. Zimmerman G, Soreq H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res.* 2006;326(2):655-69.
22. Smith C, Marks AD, Lieberman M. *Bioquímica médica básica de Mark.* 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
23. Davidson TL, Hargrave SL, Swithers SE, Sample CH, Fu X, Kinzig KP, et al. Inter-relationships among diet, obesity and hippocampal-dependent cognitive function. *Neuroscience.* 2013;253:110-22.
24. Heisler LH, Pronchuk N, Nonogaki K, Zhou L, Raber J, Tung L, et al. Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *J Neurosci.* 2007;27(26):6956-64.
25. Kanoski E, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav.* 2011;103(1):59-8.

26. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Obesity-induced cerebral hypoperfusion derived from endothelial dysfunction: one of the risk factors for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2014;11(8):733-44.
27. Bahia LR, Araújo DV. Impacto econômico da obesidade no Brasil. *Rev HUPE.* 2014;13(1):13-17.
28. United States Department of agriculture. Food away from home, 2013 [internet]. 2015 Ago [acesso em 12 Maio 2014]. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/topics/food-choices-health/food-consumption-demand/food-away-from-home.aspx>.
29. Bleich SN, Wang YC, Wang Y, Gortmaker SL. Increasing consumption of sugar-sweetened beverages among US adults: 1988-1994 to 1999-2004. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(1):372-81.
30. Nielsen SJ, Popkin BM. Changes in beverage intake between 1977 and 2001. *Am J Med Prev.* 2004;27(3):205-10.
31. Chaput JP, Klingenberg L, Astrup A, Sjödín AM. Modern sedentary activities promote overconsumption of food in our current obesogenic environment. *Obes Rev.* 2011;12(5):12-20.
32. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamento Familiares 2008-2009. Rio de Janeiro; 2010.
33. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2014: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
34. Boitard C, Cavaroc A, Sauvant J, Aubert A, Castanon N, Laye S, et al. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun.* 2014;40:9–17.
35. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894), 2000.
36. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes brasileiras de obesidade. 3.ed. Itapevi, SP: AC Farmacêutica, 2009.
37. Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE. Impacto do estilo de vida na prevalência de obesidade e diabetes. In: *Obesidade e diabetes: Fisiopatologia e Sinalização celular.* 2011:11-35.
38. Godoy-Matos AF, Cruz IC, Costa R, Junior WSS. Adipocinas: uma visão geral dos seus efeitos metabólicos. *Rev HUPE.* 2014;13(1):54-60

39. Speretta GFF, Leite RD, Duarte ACGO. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TCF-alfa e IL-10. *Rev HUPE*. 2014;13(1):61-9.
40. Landeiro FM, Quarantini LC. Obesidade: Controle Neural e Hormonal do Comportamento Alimentar. *R Ci Med Biol*. 2011;10(3):236-45.
41. Redinger RN. The pathophysiology of obesity and its clinical manifestations. *Gastroenterol Hepatol*. 2007;3(11):856-63.
42. Spiegelman MB, Flier Js. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*. 2001;104(4):531-43.
43. Queiroz JCF; Vale A, Cardoso MI; Curi R, Lima FB. Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53(5):582-94.
44. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415-45.
45. Heber D. An integrative view of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(1):280-83.
46. Bruce-Keller AJ, Keller JN, Morrison CD. Obesity and Vulnerability of the CNS. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009;1792(5):395-400.
47. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*. 2007;48(6):1253-62.
48. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappa B. *Nat Med*. 2005;11(2):183-90.
49. Ehses JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, et al. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007;56(9):2356-70.
50. Stranahan AM, Cutler RG, Button C, Telljohann R, Mattson MP. Diet-induced elevations in serum cholesterol are associated with alterations in hippocampal lipid metabolism and increased oxidative stress. *J Neurochem*. 2011;118(4):611-15.
51. Morrison CD, Pistell PJ, Ingram DK, Johnson WD, Liu Y, Fernandez-Kim SO. High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice. implications for decreased Nrf2 signaling. *J Neurochem*. 2010;114(6):1581-89.
52. Freeman LR, Zhang L, Nair A, Dasuri K, Francis J, Fernandez SK, et al. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. *Free Radic Biol Med*. 2013;56:226-33.

53. Moraes JC, Rogero MM, Souza CT. Sistema nervoso central e inflamação: descontrole nos mecanismos de fome e saciedade. In: *Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular*. Sarvier, 2011.
54. Kanoski SE, Zhang Y, Zheng W, Davidson TL. The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. *J Alzheimers Dis*. 2010;207-219 .
55. Velloso LA, Schwartz MW. Altered hypothalamic function in diet induced obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35(12):1455-65.
56. Thaler JP, Schwartz MW. Minireview: Inflammation and Obesity Pathogenesis: The Hypothalamus Heats Up. *Endocrinology*. 2010;151(9):4109-15.
57. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One*. 2012;7(1):e30571.
58. Belgardt BF, Bruning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1212:97-13.
59. Park HK, Ahima RS. Leptin signaling. *F1000Prime Rep*. 2014;6:73.
60. Schulz C, Paulus K, Jöhren O, Lehnert H. Intranasal Leptin Reduces Appetite and Induces Weight Loss in Rats with Diet-Induced Obesity (DIO). *Endocrinology*. 2012;153(1):143-53.
61. Ozcan L, Eorgin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Central Role in Development of Leptin Resistance. *Cell Metab*. 2009;9(1):35-51.
62. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1793–801.
63. Pessey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GL, Vivekanandan-Giri A, et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(5):1003-12.
64. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory lonks between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2111-17.
65. Purkayastha S, Zhang H, Zhang G, Ahmed Z, Wang Y, Cai D. Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(7):2939–44.
66. Konner AC, Bruening JC. Selective insulin and leptin resistance in metabolic dosordes. *Cell Metab*. 2012;16(2):144-52.

67. Obici S, Rossetti L. Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology*. 2003;144(12):5172-8.
68. Wisse BR, Schwartz MW. Does hypothalamic inflammation cause obesity? *Cell Metab*. 2009;10:241-42.
69. Cai H, Cong WN, Ji S, Rothman S, Maudsley S, Martin B. Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *Curr Alzheimer Res*. 2012;9(1):5-17.
70. Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated Long Chain Fatty acids Activate Inflammatory Signaling in Astrocytes. *J Neurochem*. 2012;120(6):1060-71.
71. Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, et al. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 2008;18(11):1085–88.
72. Fadel JR, Jolivald CG, Reagan LP. Food for thought: The role of appetitive peptides in age-related cognitive decline. *Ageing Res Rev*. 2013;12(3):764–76.
73. Stranahan AM, Lee K, Martin B, Maudsley S, Golden E, Cutler RG, et al. Voluntary exercise and caloric restriction enhance hippocampal dendritic spine density and BDNF levels in diabetic mice. *Hippocampus*. 2009;19:951–961.
74. Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, et al. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol*. 2010;219(1):25-32.
75. Reagan LP. Insulin signaling effects on memory and mood. *Curr. Opin. Pharmacol*. 2007;7(6):633-37.
76. Taylor VH, MacQueen GM. Cognitive dysfunction associated with metabolic syndrome. *Obes. Rev*. 2007;8(5):409-18.
77. Davis C, Levitan RD, Muglia P, Bewell C, Kennedy JL. Decision-making deficits and overeating: a risk model for obesity. *Obes Res*. 2004;12(6):929-35.
78. Izquierdo I, Barros DM, Souza TM, Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 1998;393:635-6.
79. Bernal MI. Psicobiología del aprendizaje y la memoria. CIC. Caduernos de Información y comunicación. 2005;10:221-33.
80. Izquierdo, I. Memória. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2011.
81. Casanova-Sotolongo P, Casanova-Carrillo P, Casanova-Carrillo C. La memoria. Introducción al estudio de los trastornos cognitivos en el envejecimiento normal y patológico. *Rev Neurol*. 2004;38(5):469-472.

82. Cammarota M, Bevilaqua LRM, Izquierdo I. Aprendizado e memória. In: Neurociência da mente e do comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
83. Alberini CM. Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Physiol Rev.* 2009;8(1):121-45.
84. Squire LR. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurob Learn Mem.* 2004;84:171-77.
85. Richardson JTE. Measures of Short-Term Memory: A Historical Review. *Cortex.* 2007;43(5):635-50.
86. Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron.* 2007;53(2):261-77.
87. Saab BJ, Mansuy IM. Neuroepigenetics of memory formation and impairment: The role of microRNAs. *Neuropharmacology.* 2014;80:61–9.
88. Lent, R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências. São Paulo: Atheneu, 2004.
89. Santini E, Huynh TN, Klann E. Mechanisms of translation control underlying long-lasting synaptic plasticity and the consolidation of long-term memory. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;122:131-67.
90. McGaugh JL, Izquierdo I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(6):208-10.
91. Jarome TJ, Lubin FD. Epigenetic mechanisms of memory formation and reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem.* 2014;115:116–27.
92. Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Bonini JS, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control consolidation. *Trends Neurosci.* 2006;29:496-505.
93. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to active in other brain structures. *Neurob lear Mem.* 1997;68(3):285-16.
94. Cai H, Cong WN, Ji S, Rothman S, Maudsley S, Martin B. Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *Curr Alzheimer Res.* 2012;9(1):5-17.
95. Sherwood L. Fisiologia humana: das células aos sistemas. São Paulo: Cengage Learning, 2011.
96. Winocur G, Greenwood CE. Studies of the effects of high fat diets on cognitive function in a rat model. *Neurobiol Aging,* 2005;26(1):46–9.

97. Kosari S, Badoer E, Nguyen JC, Killcross AS, Jenkins TA. Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. *Behav Brain Res.* 2012;235(1):98-03.
98. Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2011;25(2):181-13.
99. Dinel AL, André C, Aubert A, Ferreira G, Layé S, Castanon N. Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. *PloS One.* 2011;6(9):e24325.
100. Fotuhi M, Do D, Jack C. Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. *Nat Rev Neurol.* 2012;8(4):189-02.
101. Anstey KJ, Cherbuin N, Budge M, Young J. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev.* 2011;12(5):426-37.
102. Raji CA, Ho AJ, Parikshak NN, Becker JT, Lopez OL, Kuller LH, et al. Brain structure and obesity. *Hum Brain Mapp.* 2010;31(3):353-64.
103. Winkler J, Suhr ST, Gage FH, Thal LJ, Fisher LJ. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature.* 1995;375:484-87.
104. Myskiw JC, Izquierdo I, Furini CRG. Modulation of the extinction of fear learning. *Brain Res Bull.* 2014;105:61–9.
105. Scremin OU, Li MG, Scremin AM, Jenden DJ. Cholinesterase inhibition improves blood flow in the ischemic cerebral cortex. *Brain Res Bull.* 1997;42:59-70.
106. Rang HP, et al. Dependência e abuso de fármacos. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia.* Elsevier, São Paulo, Brasil, p.674-695, 2004.
107. Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull.* 2008;76(4):329–43.
108. CNS Forum. Instituto Lundbeck [internet]. 2014 [acesso em Nov 2015]. Disponível em:
https://www.cnsforum.com/educationalresources/imagebank/dementia_cholinergic/rcpt_sys_ach_esterase
109. Ferreira M, Aguiar T, Vilarinho L. Cadeia Respiratória Mitocondrial Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Déficit do Complexo I. *Arq Med.* 2008;22(2-3):49-56.

110. Yadava N, Nichols DG. Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone. *J Neurosci.* 2007;27(27):7310-17.
111. Rogge MM. The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. *Biol Res Nurs.* 2009;10(4):356-73.
112. Duarte FV, Amorim JA, Palmeira CM, Rolo AP. Regulation of Mitochondrial Function and its Impact in Metabolic Stress. *Curr Med Chem.* 2015;22(20):2468-79.
113. Yu EP, Bennett MR. Mitochondrial DNA damage and atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25:481-87.
114. Pilla C, Cardozo RF, Dutra-filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem Res.* 2003;28(5):675-9.
115. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1107-213.
116. Putti R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Frontiers in Physiology.* 2015;6:109.
117. Willian S. Mitochondrial Dysfunction in Obesity and Diabetes. *US Endocrinology,* 2010;6(1):20-27.
118. Zamora M, Villena JA. Targeting mitochondrial biogenesis to treat insulin resistance. *Curr Pharm Des.* 2014;20(35):5527-57.
119. Hansen PA, Han DH, Nolte LA, Chen M, Holloszy JO. DHEA protects against visceral obesity and muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol.* 1997;273(5):1704-8.
120. Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci.* 2007;30:123-52.
121. Coyle P, Tran N, Fung JN, Summers BL, Rofe AM. Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviors in an object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. *Behav Brain Res.* 2009;197(1):210-8.
122. Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I, Rose SP. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem.* 1999;6(6):600-7.
123. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol;* 1961;7:88-95.

124. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
125. Cassina A, Radi R. *fischer Arch Biochem Biophys.* 1996;328(2):309-16.
126. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985;153(1):23-36.
127. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta.* 1994;228(1):35-51.
128. Hughes BP. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. *Clin Chim Acta.* 1962;7:597-03.
129. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA. Brasília: CONCEA, 2013.
130. Gault VA, Lennox R, Flatt PR. Sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improves recognition memory, oxidative stress and hippocampal neurogenesis and upregulates key genes involved in cognitive decline. *Diabetes Obes Metab.* 2015;17(4):403-13.
131. Sobesky JL, Barrientos RM, De Maio HS, Thompson BM, Weber MD, Watkins LR, et al. High-fat diet consumption disrupts memory and primes elevations in hippocampal IL-1 β , an effect that can be prevented with dietary reversal or IL-1 receptor antagonism. *Brain Behav Immun.* 2014;42:22-32.
132. Boitard C, Maroun M, Tantot F, Cavaroc A, Sauvart J, Marchand A, et al. Juvenile obesity enhances emotional memory and amygdala plasticity through glucocorticoids. *J Neurosci.* 2015;35(9):4092-03.
133. Reichelt AC, Maniam J, Westbrook RF, Morris MJ. Dietary-induced obesity disrupts trace fear conditioning and decreases hippocampal reelin expression. *Brain Behav Immun.* 2015;43:68-75.
134. Heyward FD, Walton RG, Carle MS, Coleman MA, Garvey WT, Sweatt JD. Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. *Neurobiol Learn Mem.* 2012;98(1):25-32.
135. Jurdak N, Kanarek RB. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiol Behav.* 2009;96(1):1-5.

136. Darling JN, Ross AP, Bartness TJ, Parent MB. Predicting the effects of a high-energy diet on fatty liver and hippocampal-dependent memory in male rats. *Obesity* (Silver Spring). 2013;21(5):910-7.
137. Collison KS, Makhoul NJ, Inglis A, Al-Johi M, Zaidi MZ, Maqbool Z, et al. Dietary trans-fat combined with monosodium glutamate induces dyslipidemia and impairs spatial memory. *Physiol Behav*. 2010;99(3):334-42.
138. Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Manhães AC. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav Brain Res*. 2011;221:367-78.
139. Deiana S, Platt B, Riedel G. The cholinergic system and spatial learning. *Behav Brain Res*. 2011;221(2):389-11.
140. Miranda MI, Ferreira G, Ramírez-Lugo L, Bermúdez-Rattoni F. Role of cholinergic system on the construction of memories: Taste memory encoding, *Neurobiol Lear Mem*. 2003;80(3):211-22.
141. Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*. 2012;4;76(1):116-29.
142. Bournat JC, Brown CW. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010;17(5):446-52.
143. Massaad CA, Klann E. Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011;14(10):2013-54.
144. Su B, Wang X, Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Perry G, et al. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2008;5:525-32.
145. Büeler H. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2009;218(2):235-46.
146. Moreira PI, Carvalho C, Zhu X, Smith MA, Perry G. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(1):2-10.
147. Calkins MJ, Manczak M, Mao P, Shirendeb U, Reddy PH. Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2011;20:4515–29.
148. McInnes J. Insights on altered mitochondrial function and dynamics in the pathogenesis of neurodegeneration. *Trad Neurodegener*. 2013;2(1):12.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comissão de Ética no uso de animais do projeto intitulado “Avaliação da memória em um modelo animal de obesidade”.



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 06 de junho de 2015.

Registro na CEUA (código): 15.003.4.01.IV

Ao pesquisador: Gislaine Tezza Rezin
Gabriela Guzatti Francisco

Curso de Medicina - Campus Tubarão

Prezado(a) Pesquisador(a),

Vimos, através deste, informar que o projeto de pesquisa “**Avaliação da memória em um modelo animal de obesidade**” foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UNISUL.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, o disposto na legislação federal aplicável à criação e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informado imediatamente à Comissão de Ética no Uso de Animais da UNISUL.

Atenciosamente.

Peter Johann Bürger

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNISUL

Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina

☎ (48) 3279-1036

✉ ceua@unisul.br peter.burger@unisul.br



Antes de imprimir este e-mail pense em sua responsabilidade e compromisso com o MEIO AMBIENTE

ANEXO B - Parecer de Aprovação do Comissão de Ética no uso de animais do projeto intitulado "Avaliação da cadeia respiratória mitocondrial e atividade da creatina quinase em camundongos obesos".



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 02 de julho de 2015.

Registro na CEUA (código): 15.005.4.01.IV

Ao pesquisador: Gislaine Tezza Rezin
Aline Haas de Mello
Rosiane de Bona Schraiber
Luana da Rosa Souza

Curso de Medicina- Campus Tubarão

Prezado(a) Pesquisador(a),

Vimos, através deste, informar que o projeto de pesquisa **"Avaliação da cadeia respiratória mitocondrial e atividade creatina quinase em camundongos obesos"** foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UNISUL.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, o disposto na legislação federal aplicável à criação e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informado imediatamente à Comissão de Ética no Uso de Animais da UNISUL.

Atenciosamente,

Peter Johann Bürger

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNISUL

Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina

☎ (48) 3279-1036

✉ ceua@unisul.br peter.burger@unisul.br



Antes de imprimir este e-mail pense em sua responsabilidade e compromisso com o MEIO AMBIENTE