



Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde

Mestrado e Doutorado - UNISUL

LUANA DA ROSA SOUZA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM CÉREBROS DE CAMUNDONGOS APÓS INDUÇÃO DE OBESIDADE**

TUBARÃO 2016

LUANA DA ROSA SOUZA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM CÉREBROS DE CAMUNDONGOS APÓS INDUÇÃO DE OBESIDADE**

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

Souza, Luana da Rosa, 1991-
S71 Avaliação de parâmetros inflamatórios e de estresse
oxidativo em cérebros de camundongos após indução de
obesidade / Luana da Rosa Souza; -- 2016.
56 f.il. ; 30 cm

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

1. Obesidade. 2. Inflamação. 3. Estresse oxidativo. 4.
Cérebro. I. Rezin, Gislaine Tezza. II. Universidade do Sul de
Santa Catarina – Mestrado em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.398

LUANA DA ROSA SOUZA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM CÉREBROS DE CAMUNDONGOS APÓS INDUÇÃO DE OBESIDADE**

1.1 Esta Dissertação foi julgada adequada pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Mestrado, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Tubarão, 29 de Junho de 2016.

Orientador: Profa. Gislaine Tezza Rezin, Dra.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Profa. Talita Tuon, Dra.
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Profa. Josiane Somariva Prophiro, Dra.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Dedico este trabalho a minha família e ao meu noivo que são fundamentais em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e paciência concedida, pois nos momentos onde o vento soprava contrário, a fé foi fundamental para continuar remando para frente com perseverança. Agradeço a minha família, principalmente minha mãe, meu porto seguro, que me incentiva.

Ao meu noivo, pela dedicação, compreensão, amor e carinho durante todo este período.

Agradeço as minhas colegas, companheiras Rosiane de Bonna e Gabriela Guzzati por todo companheirismo e amizade. A Aline Haas por toda amizade e ajuda.

E a minha orientadora pela compreensão.

“Se meus joelhos não doessem mais, diante de um bom motivo que me traga fé...Se por alguns segundos, e só observa... Ainda assim estarei, pronto pra comemorar, se eu me tornar menos faminto, e curioso...” (O Rappa)

RESUMO

Introdução: A obesidade é um problema de saúde pública que vem alcançando proporções epidêmicas no mundo. Busca-se complementar os estudos para o esclarecimento de aspectos relacionados a fisiopatologia da obesidade reconhecendo seu envolvimento no comprometimento de funções cognitivas. **Objetivo:** Avaliar parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo no hipocampo, no estriado e no córtex pré-frontal de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica, a fim de avaliar o impacto da obesidade sobre estruturas relacionadas a cognição. **Métodos:** Camundongos Swiss machos com idade de 40 dias, foram pareados e divididos em dois grupos, os que receberam dieta hiperlipídica e controles (dieta normolipídica), submetidos a 10 semanas de experimento. Foi avaliado peso corporal, gordura visceral, níveis de citocinas (IL-1 β , IL-10, TNF- α), níveis de dano oxidativo em lipídeos e de carbonilação de proteínas e atividade da superóxido dismutase e da catalase no hipocampo, estriado e no córtex pré-frontal. **Resultados:** Neste trabalho foi identificado aumento nos níveis de IL-1 β , no hipocampo, estriado e no pré-frontal e nos níveis de TNF- α apenas no estriado e no hipocampo dos animais, quando comparado ao controle. Apenas no estriado ocorreu aumento nos níveis de IL-10. Nos parâmetros de estresse oxidativo, a avaliação de dano a lipídeos apresentou aumento no hipocampo dos animais obesos e a carbonilação de proteínas presente no hipocampo e no estriado dos animais obesos. A atividade de SOD não ocorreu diferença e a atividade da catalase, foi observado aumento no pré-frontal e inibição da sua atividade no hipocampo. **Conclusão:** Podemos sugerir, que a inflamação central quando instalada em no hipocampo, córtex e estriado pode contribuir para danos cognitivos relacionado a obesidade.

Descritores: Obesidade, inflamação, estresse oxidativo, cérebro.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a public health problem that has reached epidemic proportions in the world. Seeks to complement the studies to clarify aspects of the pathophysiology of obesity recognizing their involvement in the impairment of cognitive functions. To evaluate inflammatory and oxidative stress parameters hippocampus, striatum and prefrontal cortex of mice subjected to obesity induced by high fat diet in order to assess the impact of obesity on cognition related structures. Methods: Swiss male mice aged 40 days, were divided into two matched groups, that received the high-fat diet control group (normolipídica diet) were subjected to 10 weeks of experiment. It was estimated body weight, visceral fat, cytokines (IL-1 β , IL-10, TNF- α), oxidative damage levels in lipid and protein carbonylation and activity of superoxide dismutase and catalase in the hippocampus, striatum and prefrontal cortex. Results: In this study we identified increase in IL-1 β levels in the hippocampus, striatum and prefrontal and TNF- α levels only in the striatum and hippocampus of animals when compared to the control. As the striatum there was an increase in IL-10 levels. In parameters of oxidative stress, the assessment of damage to lipids showed an increase in the hippocampus of obese animals and carbonylation proteins present in the hippocampus and striatum of obese animals. SOD activity did not occur difference and catalase activity was observed increase in prefrontal and inhibiting its activity in the hippocampus. Conclusion: We suggest that the central inflammation when installed in the hippocampus, cortex and striatum may contribute to obesity-related cognitive impairment.

Keywords: Obesity, inflammation, oxidative stress, brain.

LISTAS

Lista de abreviaturas

TLR – Receptores Toll-like (do inglês: Toll-like receptors)

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina-10

IL-1 – Interleucina-1

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês: Tumor necrosis factor alpha)

NF- κ B – Factor Nuclear kappa B (do inglês: Nuclear Factor-kappaB)

BAX – do inglês: Bcl-2-associated X protein

BCL-2 – do inglês: B-cell lymphoma 2

IMC – Índice de Massa Corporal

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês: Deoxyribonucleic acid)

Vigitel – Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por Inquérito Telefônico

OMS – Organização Mundial da Saúde

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

ELISA – do inglês: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EROs – Espécies reativas de oxigênio

CAT – Catalase

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

GPx – Glutathione peroxidase

GRd – Glutathione reductase

GSSG – Glutathione oxidada

GSH – Glutathione reduzida

PAMPS – Padrões moleculares associados a patógenos

POMC - Proopiomelanocortina

CART - Peptídeo relacionado à cocaína e a anfetamina

NPY - Neuropeptídeo Y

AGRP - Proteína relacionada ao Agouti

Lista de figuras

Figura 1– Ciclo entre o excesso de nutrientes, a inflamação celular e a resistência a leptina e a insulina.....	19
Figura 2 – Integração de sinais periféricos e neuronais da sinalização alimentar.....	20
Figura 3 - Associação dos sistemas de defesa enzimático.	25
Figura 4. Linha do tempo - experimento de indução de obesidade.....	28
Figura 5 – Avaliação do ganho de peso em camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica.	33
Figura 6 – Avaliação da gordura visceral em camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica.....	34
Figura 7 – Avaliação das gorduras mesentérica, epididimal e retroperitoneal em camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica.....	34
Figura 8 – Avaliação dos níveis de Interleucina-1 β no hipocampo, estriado e préfrontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica.	35
Figura 9 – Avaliação dos níveis de TNF- α no hipocampo, estriado e pré-frontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica.....	36
Figura 10 – Avaliação dos níveis de Interleucina-10 no hipocampo, estriado e préfrontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica.....	37
Figura 11 – Avaliação do dano em lipídeos no hipocampo, estriado e pré-frontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica.....	38
Figura 12 – Avaliação do dano em proteínas no hipocampo, estriado e pré-frontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica.....	38
Figura 13 - Avaliação da atividade da enzima antioxidante SOD no hipocampo, estriado e pré-frontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica.....	39
Figura 14 – Avaliação da atividade da enzima antioxidante CAT no hipocampo, estriado e pré-frontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica.....	40
Lista de tabelas	
Tabela 1– Classificação do peso pelo IMC e o risco para comorbidades, segundo OMS.....	14
Tabela 2 – Tabela 2. Ingredientes da ração controle e hiperlipídica.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	13
1.1.1 Obesidade: diagnóstico, classificação e epidemiologia	13
1.1.2 Fisiopatologia da Obesidade	15
1.1.2.1 Tecido adiposo na obesidade	15
1.1.2.2 Obesidade e sistema nervoso central	17
1.1.2.3 Obesidade e inflamação	21
1.1.3 Obesidade e estresse oxidativo	22
1.1.4 Comprometimento cognitivo na obesidade	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MÉTODOS	28
3.1 TIPO DE ESTUDO	28
3.2 POPULAÇÃO/AMOSTRA	28
3.3 PROCEDIMENTOS	29
3.3.1 Indução da obesidade	29
3.3.2 Avaliação de marcadores inflamatórios	30
3.3.3 Avaliação de dano em lipídios pelos níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico-TBARS	30
3.3.4 Avaliação dos níveis de carbonilação de proteínas	31
3.3.5 Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes	31
3.4 ANÁLISE DE DADOS	32
3.5 ASPECTOS ÉTICOS	32
4. RESULTADOS	33
4.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E GORDURA VISCERAL	33
4.2 AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS	35
4.3 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	37
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	38
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

ANEXOS	60
---------------------	-----------

2. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde define sobrepeso e obesidade como um acúmulo excessivo ou anormal de gordura, que pode resultar em danos à saúde do indivíduo¹. Este acúmulo pode ser resultado de um desequilíbrio entre o aumento da ingestão calórica e o baixo gasto de energia, com origem multifatorial, incluindo fatores socioeconômicos, biológicos, psicológicos e ambientais^{1,2,3}.

A obesidade é um problema de saúde pública que vem alcançando proporções epidêmicas no mundo, afetando países ricos e pobres⁴. Segundo a Organização Mundial da Saúde mais de 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso e destes mais de 600 milhões eram obesos em 2014¹. A obesidade e o sobrepeso estão associados a um grande número de mortes no mundo, sendo que aproximadamente 3,4 milhões de adultos morrem a cada ano. Além disso, o sobrepeso e a obesidade estão associados ao risco para várias doenças como: doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2, distúrbios músculo esqueléticos e alguns tipos de câncer¹. Mais recentemente tem-se associado obesidade também a um declínio na função cognitiva, sendo evidenciado que a obesidade pode levar a déficits de aprendizagem e memória^{5,6,7,8}. Dados apresentados sobre o impacto econômico da obesidade no Brasil, mostrou que os custos totais decorrentes da obesidade e das doenças relacionadas são significativos e crescentes para os sistemas de saúde e para a sociedade⁹.

O controle da ingestão calórica e o seu balanço com o gasto energético, é um processo complexo, pois envolve um poderoso sistema biológico comandado pelo sistema nervoso central (SNC). O controle homeostático do balanço energético corporal é exercido por neurônios específicos situados, em sua maior parte, no hipotálamo, que promovem o controle da quantidade de energia armazenada na forma de gordura corporal¹⁰. Os mecanismos que levam à perda do controle homeostático do balanço energético podem ser ocasionados pelo desenvolvimento de um processo inflamatório no hipotálamo e, eventualmente, lesão neuronal, resultando em resistência local à ação da leptina e da insulina^{3,11,12}. Estudos realizados em humanos^{13,14, 15} e em roedores^{16,17,18} demonstram que estes acontecimentos estão relacionados a diversos problemas, assim como outros mecanismos oriundos de uma

dieta rica em gordura que podem ocasionar danos nas estruturas responsáveis pela cognição^{13,14,15,16,17,18}. As doenças associadas ao excesso de peso podem estar relacionadas com um processo inflamatório induzido por adiposidade. Uma vez que, produtos da ativação de adipocinas nos adipócitos provavelmente representam a ligação entre obesidade e inflamação no tecido adiposo¹⁹.

O baixo gasto energético somado a alta ingestão calórica leva ao acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo, ocasionando inflamação, hipóxia e estresse oxidativo. A instalação do processo oxidativo é decorrente de alterações no equilíbrio de moléculas oxidantes e antioxidantes, que favoreçam o aumento da produção de radicais livres e/ou diminua a defesa antioxidante. As moléculas envolvidas no estresse oxidativo são as espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e o radical hidroxilo (OH^-). O sistema de defesa antioxidante compreende os antioxidantes endógenos e exógenos, sendo eles, respectivamente, enzimas como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) entre outras e vitaminas, carotenóides, polifenóis, zinco e selênio^{20, 21, 22}.

Com o aumento da prevalência de obesidade, do risco de desenvolver outras doenças, assim como o aumento nos gastos para o controle da obesidade e das doenças associadas, torna-se necessário realizar pesquisas acerca da complexa fisiopatologia da obesidade. Para tentar identificar a relação de processos inflamatórios, dos danos causados por radicais livres e do desequilíbrio da atividade das enzimas antioxidantes no dano do hipocampo, estriado e do córtex pré-frontal, relacionados a cognição, torna-se necessário estudos destes parâmetros no SNC de camundongos obesos.

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.1 Obesidade: diagnóstico, classificação e epidemiologia

A obesidade é definida como o acúmulo de gordura anormal ou excessiva. Para o acúmulo de gordura corporal várias medidas são utilizadas, sendo as mais comuns a relação circunferência abdominal/quadril, dobra cutânea e o índice de massa corporal (IMC). O IMC, mais utilizado para classificar sobrepeso e obesidade em

adultos, não faz distinção entre massa gordurosa e massa magra, portanto seu resultado não reflete a distribuição da gordura corporal, gerando erro na avaliação do paciente^{1,23,24}.

O IMC é um índice simples definido como o peso do indivíduo em quilogramas dividido pelo quadrado da sua altura em metros^{1, 24}. Para avaliar o nível ou o grau de obesidade é utilizada uma classificação feita pela Organização Mundial da Saúde (OMS), baseada em padrões internacionais, descrita na Tabela 1. Unir a avaliação da medida de circunferência abdominal com o IMC pode ajudar a diminuir as limitações destes parâmetros²⁵.

Tabela 1 - Classificação do peso pelo IMC e o risco para comorbidades, segundo OMS.

Classificação	IMC (kg/m²)	Risco de comorbidades
Baixo peso	< 18,5	Baixo
Peso normal	18,5-24,9	Médio
Sobrepeso	≥ 25	Aumentado
Pré-obeso	25,0 a 29,9	Moderado
Obeso I	30,0 a 34,9	Grave
Obeso II	35,0 a 39,9	Muito grave
Obeso III	≥ 40,0	Riscos de comorbidades

Fonte: Adaptado, Abeso 2009.²⁴

Resultados de um estudo realizado nos Estados Unidos pelo World Obesity durante 2011-2012 constatou que 8% das mulheres com idade superior a vinte anos eram obesas mórbidas e 35,8% eram obesos, dos homens 4,3% eram obesos mórbidos e 33,3% eram obesos²⁶. Pesquisa realizada nas capitais brasileiras entre os anos de 2006 e 2012 apontou um grande problema no crescimento do excesso de peso e da obesidade no Brasil, sendo que o aumento é de mais de um ponto percentual ao ano para o excesso de peso e de quase um ponto percentual para obesidade. Esses resultados, demonstram que mantida essa tendência, em mais dez anos, cerca de dois terços dos brasileiros residentes naquelas cidades terão excesso de peso e cerca de um quarto serão obesos²⁷.

Segundo a pesquisa Vigitel 2014 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) realizada pelo Ministério da Saúde revela que, apesar dos níveis de obesidade estarem estáveis nos últimos anos, o percentual de excesso de peso atinge mais da metade da população brasileira adulta (52,5%). A proporção de obesos é ligeiramente maior entre as mulheres (18,2%), quando comparado aos homens (17,6%), porém em relação ao excesso de peso, os homens apresentam percentuais mais expressivos, 56,5% contra 49,1% das mulheres²⁸. Um estudo de prevalência realizado no sul do Brasil com mulheres usuárias de serviços de pronto-atendimento do Sistema Único de Saúde entre agosto de 2006 e julho de 2007, mostrou que 64,3% apresentavam sobrepeso e obesidade e 44,1% obesidade central, estes resultados estão associados a um aumento do número de agravos à saúde²⁹. Outro estudo, realizado com adultos em Florianópolis, Santa Catarina apresentou prevalência de obesidade central de 50,5% para os homens e 38,9% para as mulheres³⁰.

2.1.2 Fisiopatologia da Obesidade

A obesidade apresenta complexa fisiopatologia, sendo que a perda do controle da ingestão e do gasto energético pode representar o mecanismo de seu desenvolvimento através de desequilíbrio positivo, pois ocorrerá maior acúmulo de energia e conseqüente ganho de peso^{31,32}. Estudos mostram que esta regulação depende de vários fatores para manter a homeostase, dentre eles estão o envolvimento de estímulos centrais e periféricos, oriundos de neurônios (orexígenos e anorexígenos) e hormônios^{3,33}.

2.1.2.1 Tecido adiposo na obesidade

Diversos tecidos desempenham papel fundamental no controle de depósitos de gordura no corpo, sendo o tecido adiposo o principal reservatório energético. O tecido adiposo é um tecido heterogêneo, pois possui diferentes células, como células do sistema imune (macrófagos), pré-adipócitos e os adipócitos e células especializadas no armazenamento de lipídios^{32,34,35,36,37}. Os lipídios são armazenados na forma de

triacilglicerol, em períodos de abundante oferta de energia no citoplasma dos adipócitos^{32,34,35,36,37}. Estas reservas podem ser mobilizadas para síntese de ácidos graxos (lipólise) quando ocorre baixa oferta de energia para os tecidos, este processo está ativado em indivíduos obesos, podendo estar relacionado a presença de resistência à insulina^{32,34,35,36,37}. Em indivíduos obesos as células do tecido adiposo encontram-se aumentadas (hipertrofia) e em maior número (hiperplasia), assim como há aumento na produção de adipocinas^{38,39,40}. O estado de hiperplasia pode levar a um processo de hipóxia dos adipócitos, que é capaz de gerar uma alteração no equilíbrio das atividades pró e anti-inflamatórias no tecido adiposo, levando a expressão de citocinas inflamatórias pela ativação dos fatores de transcrição, como Fator Nuclear kappa B (NF-kB), assim como na elevação da infiltração de macrófagos^{41,42,43,44,45,46}. Os macrófagos ativados no tecido adiposo são responsáveis pela expressão significativa de TNF- α e de IL-6^{43,47}.

Os macrófagos encontram-se em grande número no tecido adiposo e estão presentes na inflamação relacionada com a obesidade, pois em indivíduos obesos, seu número aumenta significativamente, através do aumento da sua infiltração neste tecido. A obesidade induzida por dieta leva a uma mudança no estado de ativação dos macrófagos, pois se encontram no estado M2 polarizado em animais magros, que estão uniformemente dispersos por todo o tecido e protegem as células deste tecido da inflamação, e em obesos encontram-se no estado pró-inflamatório M1, que contribui para a resistência à insulina. Os macrófagos M1 estão em torno dos adipócitos mortos no tecido inflamado, formando estruturas parecidas com coroas e representam uma fonte importante de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-1 β , entre outras), que desempenham papéis importantes nas respostas inflamatórias crônicas no tecido adiposo na obesidade^{48, 49,50,51,52,53}.

O tecido adiposo na obesidade apresenta diversas alterações, entre elas, o estresse do retículo endoplasmático, o aumento de leptina e a lipólise, diminuição de adiponectina e da adipogênese, morte dos adipócitos e resistência à insulina^{54,55}. A resistência à insulina ocorre com a perda da capacidade dos tecidos, principalmente músculo esquelético, tecido adiposo e fígado, em responder corretamente a ação deste hormônio, podendo estar associada a diversos problemas de saúde, como a obesidade. Fatores como aumento dos ácidos graxos livres na circulação, inflamação crônica, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial estão sendo relatados como

processos participantes no desenvolvimento da resistência à insulina^{56,57}. O mecanismo preciso pelo qual ocorre a resistência à insulina ainda não está completamente definido. O estado de inflamação crônica nos tecidos é sugerido como parte contribuinte no processo de resistência à insulina na obesidade e nas doenças relacionadas^{56,57}.

Os ácidos graxos podem estar relacionados a outros processos, não somente a resistência à insulina, pois eles ativam as vias de sinalização inflamatórias através da interação com receptores da família de tipo Toll (TRL) e, indiretamente, através da secreção de citocinas, como o TNF- α , IL-1 β e IL-6^{58,59}. Receptores do tipo Toll-like são uma classe que faz reconhecimento de padrões moleculares associados a agentes patogênicos altamente conservados (PAMPs) microbianos, gerando ativação do sistema imunológico para promoção da síntese e secreção de células do sistema imunológico. Para a ativação de TRL, estes identificam estruturas específicas para realizar a identificação de determinados fatores, como por exemplo receptor TRL-2 que reconhece lipopeptídeos bacterianos e o receptor TRL-4 que reconhece lipopolissacarídeos. A expressão do receptor TRL-4 está aumentada em macrófagos na obesidade, estes são capazes de detectar componentes da parede celular bacteriana e identificam também ácidos graxos livres no tecido adiposo e são ativados iniciando uma resposta inflamatória^{58,59,60,61,62,63}.

Um estudo que utilizou a cultura de adipócitos e macrófagos descreveu a ocorrência da ativação de NF- κ B e que sua inibição farmacológica suprimiu a produção de citocinas pró-inflamatórias e lipólise dos adipócitos. Estes resultados sugerem que os ácidos graxos saturados, liberados por adipócitos hipertrofiados através da lipólise induzida por macrófagos, serve como um sinalizador para o receptor TLR-4, levando a alterações inflamatórias através da ativação de NF- κ B⁶⁴.

2.1.2.2 Obesidade e sistema nervoso central

As primeiras evidências do envolvimento do SNC no controle do peso corporal e da patogênese da obesidade surgiram em estudos realizados no final de 1930 e início de 1960^{65,66,67}. Com base nestes estudos, os núcleos do hipotálamo foram identificados como áreas que participam da homeostase energética normal, sendo o

hipotálamo responsável por administrar diversas funções metabólicas corporais, como o controle do apetite^{65,66,67}.

Sinais neuronais, hormonais e sinais liberados quando há ingestão de alimentos constituem uma rede de comunicação do hipotálamo com sinais periféricos do intestino, pâncreas, fígado, tecido adiposo e tronco cerebral. Através destes sinais o hipotálamo modula o apetite, por respostas anorexígenas e orexígenas⁶⁸. Outros fatores estão relacionados ao controle alimentar, desde a percepção sensorial antes e durante o consumo do alimento, a decisões tomadas na forma da alimentação (escolher o alimento, quando comer e quando parar de comer) que unidos aos estímulos hormonais, configuram no cérebro uma rede integrada de sinais que determinam a composição, a frequência e o tamanho das refeições^{69,70}. O núcleo do hipotálamo com maior importância para o controle alimentar é o núcleo arqueado. Nele estão localizados os neurônios responsáveis pelos estímulos anorexígenos e orexígenos, são coexpressos neuropeptídeos anoréticos, pro-ópiomelanocortina (POMC), peptídeo semelhante a galanina e peptídeo relacionado à cocaína e a anfetamina (CART) e outra população de orexígenos o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao Agouti (AGRP)^{68,71,72}. Tanto os neurônios NPY/AGRP quanto POMC/CART são sensíveis a ação de hormônios como a insulina e a leptina, considerando que a insulina regula o apetite em curto prazo e a leptina a longo prazo. A leptina, produzida no tecido adiposo, suprime o apetite informando ao cérebro o excesso de tecido adiposo, pelo bloqueio do NPY, assim como a insulina^{71,73}.

Uma revisão feita em 2010, sobre obesidade e inflamação, apresentou evidências de que a inflamação hipotalâmica resultante da alimentação com elevado teor de gordura contribui para o surgimento da obesidade através do desenvolvimento da resistência central a leptina e a insulina. Sendo que, o consumo excessivo de nutrientes leva ao aumento energético que provoca inflamação celular nos tecidos periféricos e no hipotálamo e a ativação resultante das vias inflamatórias geram resistência a insulina e leptina, e por consequência, promove a obesidade e diabetes (Figura 1)⁷⁴.



Figura 1 – Ciclo entre o excesso de nutrientes, a inflamação celular e a resistência a leptina e a insulina.

Fonte: Adaptado, Thaler, 2010⁷⁴.

A resistência à leptina pode surgir através de diversos tipos de danos e está relacionada a todas as formas de obesidade. Sabe-se que a sinalização da inflamação hipotalâmica que contribui para a presença de resistência a insulina nos tecidos periféricos, tais como o fígado, músculo e tecido adiposo⁷⁵.

O controle da ingestão de alimentos além de ser modulada por sinais oriundos do estômago, do intestino e de nutrientes (figura 2), sofre ações de um cérebro “cognitivo” que coordena atitudes desenvolvidas através das experiências prévias aos alimentos, sendo o responsável pela organização destas informações o sistema límbico^{73,76}. As estruturas cerebrais do sistema límbico estabelecem mecanismos de resposta com o hipotálamo lateral para juntos atribuírem um valor hedônico ao alimento, como sabor, aparência, textura e outros^{73,76}. O sistema límbico funciona como um centro de recompensa, onde a dopamina é um neurotransmissor importante para o processamento do prazer na ingestão de alimentos palatáveis, configurando a via responsável pelo vício ao alimento. Os componentes que envolvem a recompensa ao alimento são três: a aprendizagem, o gosto, que reflete a experiência imediata ou antecipação do prazer e o querer, que é a motivação levando ao aumento do apetite e ao forte desejo aos alimentos^{73, 77}.

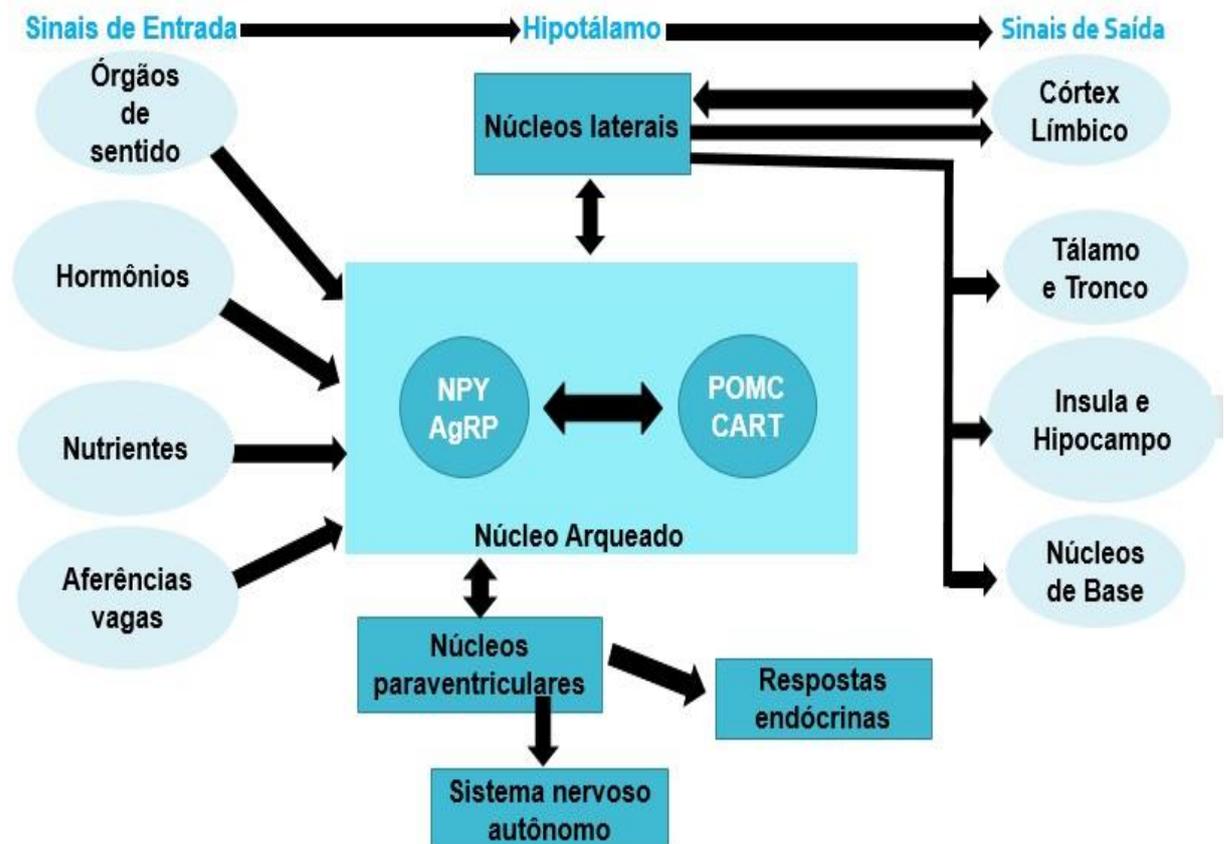


Figura 2 - Integração de sinais periféricos e neuronais da sinalização alimentar.
 Fonte: Damiani, 2010⁷³.

Estímulos gerados pelos alimentos são detectados por vários órgãos sensoriais e transmitido para o sistema de recompensa que é formado pelo estriado, a área tegmental ventral, núcleo accumbens, o córtex insular, o córtex cingulado anterior e o córtex orbitofrontal⁷⁸. O sistema de recompensa pode ser definido como o processo pelo qual certos comportamentos são reforçados em resposta a estímulos ambientais específicos, este sistema processa as informações de palatabilidade dos alimentos e gera percepção do sabor dos alimentos e "gostar" psicológico de alimentos que irão reforçar os comportamentos relacionados com a aquisição e consumo de alimentos "gratificantes" ^{79,80,81,82,83,84,85}.

Os mecanismos de aprendizagem e memória também estão envolvidos no controle do comportamento alimentar, através da representação na memória obtida de uma diversidade de informações assimiladas nas experiências com os alimentos. Diferentes estruturas cerebrais estão compreendidas no processo de aprendizado e memória dos alimentos, sendo o hipocampo a principal estrutura envolvida^{86,87}.

2.1.2.3 Obesidade e inflamação

A inflamação é uma resposta fisiológica necessária para restaurar a homeostase, porém quando estabelece um estado crônico pode causar danos. Estudos têm demonstrado que o consumo de nutrientes pode de forma rápida ativar respostas inflamatórias^{70,81}. A presença dos mecanismos inflamatórios e sua ocorrência na obesidade ainda não estão bem descritos na literatura, mas sabe-se que existem citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo e no SNC e que as principais identificadas são TNF- α , IL-6 e IL-1 β ^{70,81}.

A primeira ligação entre obesidade e inflamação foi descrita em 1993, e demonstrou que o tecido adiposo de animais obesos, secretam TNF- α e desempenham papel direto na resistência à insulina induzida pela obesidade⁸⁸. O processo inflamatório no tecido adiposo é acompanhado por um baixo grau de inflamação crônica. Neste processo, também estão envolvidas células imunes residentes neste tecido, que desempenham papel de indução e regulação, apesar de, já estarem presentes, ocorre um aumento significativo na obesidade^{89,90}.

Vários mecanismos estão envolvidos na inflamação do tecido adiposo, sendo eles, a resposta ao estresse de adipócitos (hipertrofia, hipóxia, e estresse do retículo endoplasmático), a secreção de adipocitocinas e a adesão de um fenótipo semelhante a macrófagos, estando estes interligados⁹¹. A hipóxia que ocorre no tecido adiposo de obesos está envolvida no processo de iniciação da inflamação, com alteração do equilíbrio entre as atividades pró e anti-inflamatórias⁹². Nas células, a hipóxia induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias por ativação dos fatores de transcrição como, por exemplo, NF-kB^{93,94}.

Quanto à inflamação hipotalâmica, vários mecanismos estão envolvidos no seu desenvolvimento, quando expostos a alimentação com elevado teor de gordura. O receptor do tipo TLR-4, um componente do sistema imune inato no SNC, está envolvido no processo de inflamação hipotalâmica⁷⁴. Tal receptor, quando ativado durante a alimentação com elevado teor de gordura, pode causar a expressão de mediadores inflamatórios, levando a resistência neuronal da leptina e insulina. Outro mecanismo, envolvido é estresse do retículo endoplasmático, sendo que sua presença está acompanhada com atividades pró-apoptóticas⁹⁵.

Maric e colaboradores⁹⁶ investigaram a existência da relação entre a ingestão de dieta rica em gordura e o desenvolvimento da inflamação. No sangue e no tecido adiposo não foram identificadas alterações nos mediadores inflamatórios. No entanto, no hipotálamo foram identificadas através de uma maior expressão de marcadores de ativação glial, de IL-1 β , de IL-6 e NF-kB. Os autores propuseram que seus resultados indicaram que o consumo de dietas ricas em gordura está associado a inflamação hipotalâmica.

O estudo de Thaler⁹⁷ e colaboradores buscaram identificar as correlações neuroanatômicas da inflamação hipotalâmica associada à obesidade e determinar a ocorrência de respostas semelhantes em seres humanos. A inflamação hipotalâmica foi identificada desde a quarta semana de consumo da dieta com alto teor de gordura, neste período não foi detectada no fígado ou no tecido adiposo, sugerindo assim, que a dieta tenha desencadeado a expressão do gene inflamatório no hipotálamo, parecendo ser pouco provável que esta tenha iniciado a partir de um processo inflamatório sistêmico. Os autores também relataram sobre a lesão hipotâmica, mostrando que estava evidente no núcleo hipotalâmico arqueado de ratos desde a primeira semana que receberam a dieta, diminuindo temporariamente em resposta a mecanismos neuroprotetores, mas a alimentação contínua restabelece este processo. Os resultados encontrados propõem que tanto em seres humanos como em modelos de roedores, a obesidade está associada com lesão neuronal no hipotálamo.

O processo inflamatório na obesidade induzida por dieta, está associada a um aumento do estresse oxidativo, relacionado com a resistência à insulina e a leptina, levando a alterações metabólicas^{98,99}. A leptina desempenha papel importante na mediação de estado pró-inflamatório de indivíduos obesos e também na indução do estresse oxidativo^{98,99}. Dois mecanismos estão descritos por ocasionar estresse oxidativo induzido por leptina: a estimulação da oxidação mitocondrial de ácidos graxos e a elevação de citocinas pró-inflamatórias^{100, 101, 102}.

2.1.3 Obesidade e estresse oxidativo

O processo de estresse oxidativo é definido pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs; radicais livres e as espécies reativas não radicais) e/ou diminuição das defesas antioxidantes^{20, 21, 22, 98}. Os radicais livres são

moléculas de oxigênio que contém número ímpar de elétrons na última camada eletrônica, um elétron livre, que é a característica que lhe confere alta reatividade com qualquer biomolécula na qual estabelece um contato⁹⁸. EROs podem ocorrer tanto em condições fisiológicas, em níveis controlados, assim como estão presentes em muitas doenças, onde não ocorre o controle da sua formação levando a diferentes danos. Sua geração está envolvida num processo contínuo e fisiológico, presente por exemplo na produção de energia (ATP) na cadeia transportadora de elétrons, a defesa durante o processo de infecção e outras funções¹⁰³. Porém sua produção excessiva pode levar a danos oxidativos, devido a sua capacidade altamente reativa, EROs podem oxidar lipídeos de membrana, alterar a função de proteínas estruturais e funcionais da célula, oxidar o DNA e gerar mutações significativas em genes importantes, podendo ter como resultado o desencadeamento de apoptose celular até a geração de linhagens tumorais.^{20, 21, 22,98,103}.

EROs são resultantes do metabolismo do oxigênio, gerados principalmente como subprodutos da respiração mitocondrial¹⁰³. Os radicais livres ou provocam ou resultam de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se^{21,104}. Em condições fisiológicas o O₂ sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água, durante este processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O₂⁻), hidroperoxila (HO₂) e hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A mitocôndria é responsável pelo maior consumo do oxigênio na célula por meio da cadeia transportadora de elétrons, na produção de ATP, e também é um dos principais alvos. O comprometimento da função mitocondrial causada por dano induzido por EROs, a peroxidação lipídica ou oxidação de proteínas podem também conduzir à morte celular apoptótica^{103, 104, 105, 106}.

Em resposta a produção de radicais livres temos os mecanismos protetores, antioxidantes, que têm a função de neutralizar os compostos reativos e, conseqüentemente, inibir e/ou reduzir os efeitos adversos do estresse oxidativo. Este mecanismo é composto por moléculas enzimáticas e não enzimáticas (origem endógena ou dietética). O mecanismo de defesa enzimático é constituído pelas enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). As enzimas CAT e GPx agem com a finalidade de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio, importante ação, pois esta espécie reativa participa da

geração do radical OH, contra o qual não há sistema enzimático de defesa. A enzima SOD, corresponde a uma família, que compreende a SOD-cobre-zinco, presente principalmente no citoplasma, e a SOD-manganês localizada na mitocôndria, estas são dependentes de co-fatores para sua ação. Conforme a figura 3, a enzima SOD por meio da reação de dismutação, catalisa a geração de H_2O_2 a partir do radical superóxido e as enzimas CAT e GPx agem impedindo o acúmulo de H_2O_2 . Esta espécie reativa (H_2O_2) possibilita, através das reações de Fenton e Haber-Weiss, a geração do radical OH. A GPx reduz o H_2O_2 à água, na conversão da glutatona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). E a glutatona redutase (Grd) é responsável pela recuperação da GSH^{21, 22, 107}.

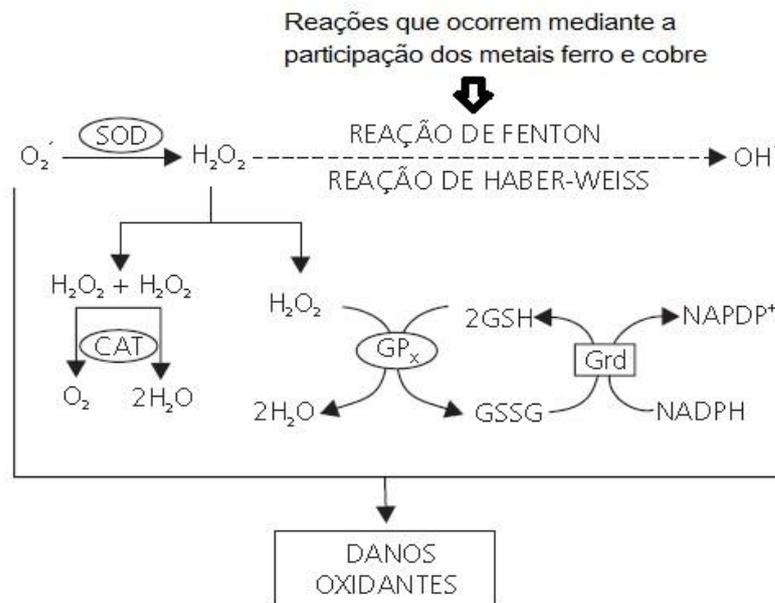


Figura 3 – Associação dos sistemas de defesa enzimático.

Fonte: Barbosa, 2010²¹.

O tecido adiposo branco é produtor de várias substâncias, entre elas as citocinas³⁵. Estas citocinas contribuem para inflamação sistêmica na obesidade, e conseqüentemente a elevada produção de EROs¹⁰⁸. Um estudo que avaliou crianças gravemente obesas em comparação com crianças com peso normal, identificaram que as obesas apresentaram maiores concentrações de marcadores de formação de óxido nítrico, associados ao aumento de marcadores de estresse oxidativo e a inflamação¹⁰⁹. Em outros estudos^{110,111,112} que avaliaram a obesidade e marcadores de estresse

oxidativo em humanos, descreveram que as enzimas antioxidantes GPx, CAT e SOD estão com suas atividades diminuídas.

São diversos os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de estresse oxidativo na obesidade. O consumo excessivo de gordura e carboidratos associados a obesidade podem fazer parte do mecanismo que leva a produção aumentada de EROs, devido à saturação da cadeia de transporte de elétrons¹¹³. Um dos mecanismos é a oxidação dos ácidos graxos, que podem produzir EROs, outro mecanismo é o excesso de consumo de oxigênio, que gera radicais livres na cadeia respiratória mitocondrial, juntamente com a fosforilação oxidativa em mitocôndrias e as dietas ricas em gordura que são capazes de gerar EROs, pois podem alterar o metabolismo do oxigênio. O aumento do tecido adiposo em obesos também está relacionado ao estímulo na produção de EROs, pois os adipócitos e pré-adipócitos, em maior número, são fontes de TNF- α , IL-1 β , e IL-6, que estão relacionadas ao estímulo a produção de EROS^{21, 113, 109,114}.

2.1.4 Comprometimento cognitivo na obesidade

Sabe-se que a obesidade está relacionada a diversos problemas de saúde, já descritos anteriormente, mais recentes estudos estão relacionando também a problemas cognitivos, aumento no risco de demência na meia idade, como a doença de Alzheimer^{115,116,117}. Autores sugerem que a dieta com elevado teor de gordura leva a déficits de aprendizagem e memória^{118,119}, assim como atrofia cerebral¹²⁰. Estudo que avaliou a influência do IMC sobre o volume cerebral identificou que a elevação do IMC está associada a um volume cerebral reduzido¹²⁰. Outros estudos também corroboram com a associação da obesidade com a atrofia cerebral^{121,122,123,124}. Compreende-se que o hipocampo possui papel importante sobre a cognição e a memória, e que regiões frontais do cérebro são responsáveis por funções executivas, sendo que o volume destas regiões cerebrais está vulnerável ao efeito da obesidade^{122,125}. Embora ainda não se tenha muitas evidências, é possível questionar sobre o envolvimento da atrofia em regiões frontais do cérebro e no hipocampo como um dano que contribui para o comprometimento cognitivo em obesos.

Cada vez mais estudos vêm demonstrando que a obesidade está associada a um baixo grau de inflamação nos tecidos periféricos e na circulação^{70,81,85,126}. E que

este processo de inflamação também está presente no SNC, principalmente no hipotálamo^{74,96,97,127}. Vários mecanismos estão sendo proposto para causa de disfunção cognitiva na obesidade, entre eles a participação da inflamação sistêmica e central, que além de afetar as vias para regulação da alimentação, também comprometem funções cognitivas¹²⁷. Estudo realizado para avaliar o comprometimento cognitivo após administração de dieta rica em gordura e dieta ocidental demonstrou que a dieta rica em gordura pode levar ao comprometimento cognitivo relacionado à inflamação presente no cérebro⁷¹.

O hipotálamo é responsável por diversas funções fisiológicas, e muitas destas estão correlacionadas a atenção, aprendizagem e memória¹²⁷. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal desempenha importante papel na função cognitiva¹²⁷. Vem sendo evidenciado que este eixo apresenta hiperatividade na obesidade e gera consequente hipersecreção de glicocorticóides¹²⁸. Esta hiperatividade relacionada com hipersecreção de glicocorticóides tem sido associada a danos no hipocampo¹²⁹, podendo levar a comprometimento da função cognitiva¹²⁷.

A obesidade está afetando cada vez mais pessoas, alcançado proporções epidêmicas em todo o mundo¹⁰. Apresentar níveis epidêmicos é preocupante, pois indivíduos obesos apresentam diversas doenças associadas, assim como complicações¹. Busca-se complementar os estudos para o esclarecimento de aspectos relacionados a fisiopatologia da obesidade reconhecendo seu envolvimento no comprometimento do hipocampo, do estriado e do córtex pré-frontal para entender sua ligação com o desenvolvimento do déficit cognitivo em pacientes obesos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo no hipocampo, no estriado e no córtex pré-frontal de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica, a fim de avaliar o impacto da obesidade sobre estruturas relacionadas a cognição.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar os níveis de citocinas IL-1 β , IL-10, TNF- α em camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Mensurar os níveis de dano oxidativo em lipídeos e de carbonilação de proteínas em camundongos submetidos a obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Avaliar atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase de camundongos submetidos a obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

4. MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental utilizando modelo animal de obesidade por dieta hiperlipídica.

4.2 POPULAÇÃO/AMOSTRA

Foram utilizados camundongos Swiss machos (25-35g) com idade de 40 dias obtendo-se os exemplares do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Utilizou-se 40 camundongos, randomizados e divididos em dois grupos, obesos (dieta hiperlipídica) e controles (dieta normolipídica), a descrição da utilização dos animais está detalhada na linha do tempo (figura 4). Os animais receberam água e ração em livre acesso e foram mantidos nos ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura de $23\pm 1^\circ\text{C}$.

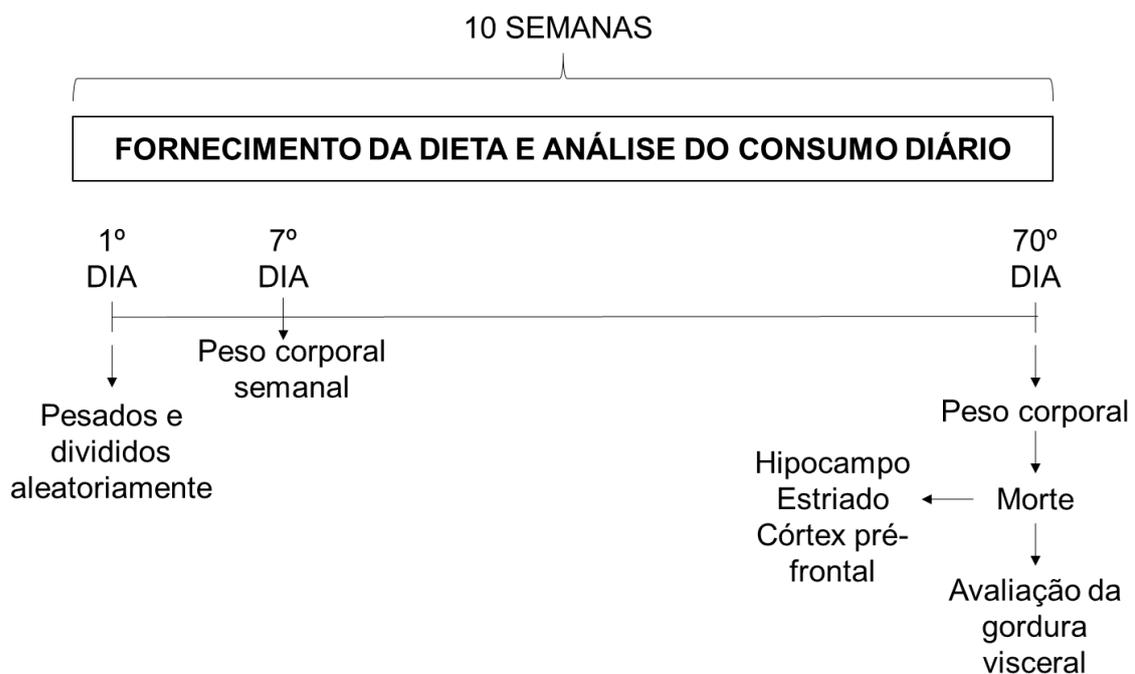


Figura 4. Linha do tempo - experimento de indução de obesidade.

4.3 PROCEDIMENTOS

A execução do projeto ocorreu no Laboratório Neuroimet da UNISUL, Tubarão (SC), Bloco da Saúde. E a utilização dos animais seguiu os princípios de cuidado e manejo ético descritos na Diretriz Brasileira para Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) de 2013¹³⁰.

4.3.1 Indução da obesidade

O protocolo para indução da obesidade e a composição das dietas foi baseado em estudos anteriores^{131,132}. Os ingredientes e suas quantidades nas rações utilizadas estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Ingredientes da ração controle e hiperlipídica.

COMPOSIÇÃO E VALOR CALÓRICO A CADA 1000G (1KG) DE RAÇÃO				
INGREDIENTES	Ração controle		Ração 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	-	-	312	2808
CELULOSE	50	-	50	-
MIX DE MINERAIS	35	-	35	-
MIX DE VITAMINAS	10	-	10	-
L-CISTINA	3	-	3	-
BITARTARATO DE COLINA	2,5	-	2,5	-
BUTIL HIDROXITOLUENO (BHT)	0,028	-	0,028	-
TOTAL	1000,028	3798	1000,028	5358

Fonte: Adaptado de PragSoluções Biociências, Cintra et al.¹³¹ e Razolli et al.¹³².

Os animais foram pesados e divididos, aleatoriamente, em 2 grupos de igual número: controles e obesos. O experimento teve duração de 10 semanas. A ração dos animais foi comprada de uma empresa especializada em desenvolvimento e produção de dietas padronizadas para experimentação animal, para garantir que os ingredientes e a quantidade de micronutrientes não fossem diferentes.

O parâmetro de consumo alimentar foi mensurado durante todo o experimento, diariamente, através do cálculo da diferença entre a quantidade de ração oferecida aos animais e a quantidade restante na gaiola, após vinte e quatro horas. O peso corporal foi verificado semanalmente.

A gordura visceral foi mensurada, conforme descrito por Hansen e colaboradores (1997)¹³³. Os resultados foram expressos como gramas de gordura por 10g de peso corporal (g/10g).

Os animais foram mortos após 10 semanas de experimento, seguindo as especificações, dos princípios de cuidado e manejo descritos na Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) de 2013¹³⁰. Houve a retirada da gordura visceral, coletada das regiões mesentérica, epididimal e retroperitoneal, sendo lavada e pesada em balança de alta precisão, o cérebro retirado e isolado o hipocampo, estriado e córtex pré-frontal separadamente e armazenados a -80°C para análises inflamatórias e bioquímicas.

4.3.2 Avaliação de marcadores inflamatórios

Os níveis dos marcadores inflamatórios, IL-1 β , IL-10 e TNF- α foram avaliados no hipocampo, estriado e córtex pré-frontal e determinados pelo ensaio imunoenzimático - ELISA, conforme kit comercial (R&D Systems, Minneapolis, MN). O princípio da técnica se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas.

4.3.3 Avaliação de dano em lipídios pelos níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico-TBARS

A produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um marcador de peroxidação lipídica. Esta técnica se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico reagir com substâncias, como por exemplo o malondialdeído (MDA),

provenientes da lesão oxidativa em membranas celulares conferindo uma coloração rósea, a solução que poderá ser mensurada por espectrofotometria. A técnica é realizada inicialmente através da homogeneização das amostras, misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,67%. A seguir, a mistura é aquecida em banho maria a 100°C durante 30 minutos. O equivalente de malondialdeído (MDA) é determinado pela absorvância de 532 nm usando 1,1,3,3 – tetrametoxipropano. Os resultados foram expressos como equivalentes de MDA (nmol/mg de proteína)¹³⁴.

4.3.4 Avaliação dos níveis de carbonilação de proteínas

O dano oxidativo em proteínas foi mensurado pela quantificação de grupamentos carbonilas baseada na reação com dinitrofenilhidrazina, conforme descrito por Levine e colaboradores¹³⁵. Em síntese, a técnica se baseia na precipitação de proteínas pela adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina, e a absorvância é lida num espectrofotômetro a 370 nm. Os resultados foram expressos como níveis de proteínas carboniladas por miligrama de proteína (nmol/mg de proteína).

4.3.5 Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

Foi avaliada a atividade de duas enzimas com atividade antioxidante: a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Ambas metodologias são mensuradas através de espectrofotometria. A atividade de CAT é avaliada segundo a método descrito por Aebi¹³⁶, que consiste na decomposição H_2O_2 para gerar H_2O e O_2 , medindo a taxa de decaimento da absorvância do peróxido de hidrogênio em 240nm, representada como unidades por miligrama de proteína. A atividade da SOD foi determinada pela avaliação na sua capacidade de inibir a auto-oxidação da adrenalina, este processo de oxidação leva a formação do adenocromo, que confere cor à solução, a velocidade da sua formação é medida em 480nm, podendo avaliar a atividade da SOD, conforme descrito na literatura¹³⁷. Os resultados foram expressos como unidades/ mg de proteína.

4.4 ANÁLISE DE DADOS

A análise estatística foi feita através do programa estatístico Statistical Package for the Sciences (SPSS). Os dados foram avaliados por Teste t student. Será considerada significância estatística para valores de $p < 0,05$. Para constituição da amostra levou-se em consideração estudos prévios, adotando uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos e uma variância de no máximo 10% entre as médias. Para o tamanho de amostra calculou-se para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%.

4.5 ASPECTOS ÉTICOS

O formulário foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL, sendo aprovado conforme código 15.002.4.01.IV (anexo A).

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E GORDURA VISCERAL

Após 10 semanas os animais do grupo controle e do obeso apresentaram ganho de peso. A partir da terceira semana de experimento os animais do grupo obeso apresentaram ganho de peso superior aos animais do grupo controle, sendo esta diferença significativa, conforme figura 5. A avaliação da gordura visceral (Figura 6), teve um aumento significativo no grupo obeso quando comparado ao grupo controle, porém quando analisada individualmente as gorduras mesentérica, epididimal e retroperitoneal (Figura 7) apenas a gordura mesentérica apresentou aumento significativo, quando comparado ao grupo controle.

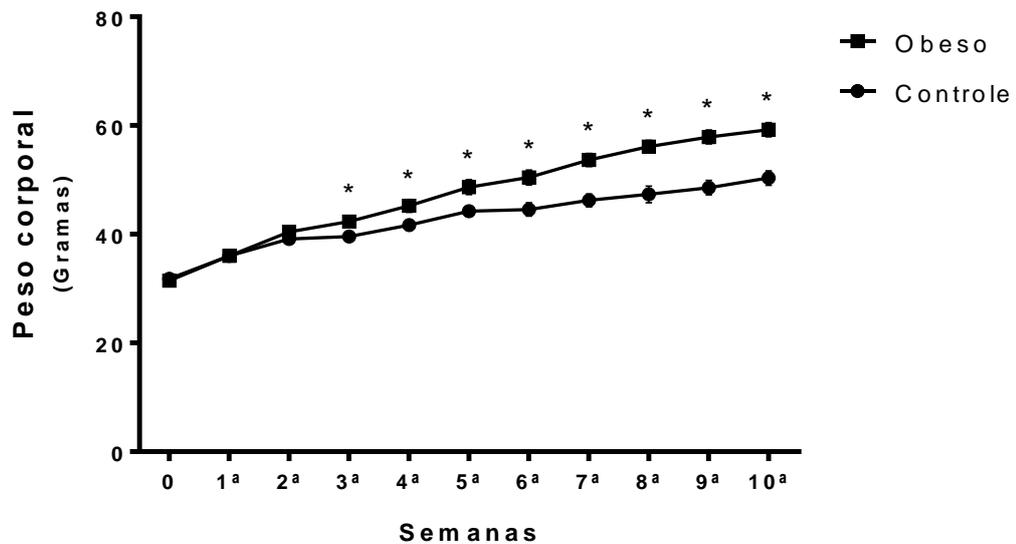


Figura 5 – Avaliação do ganho de peso em camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica. Os valores foram considerados significativos para * $p < 0.05$.

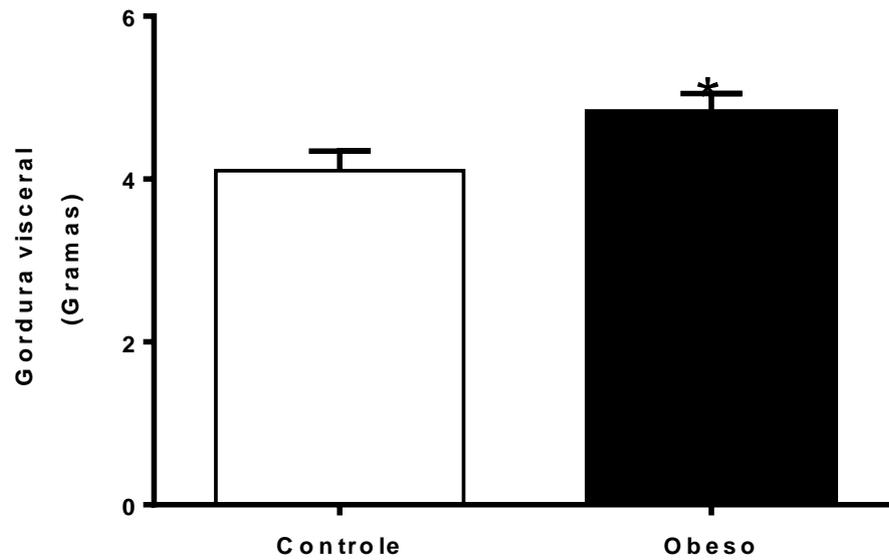


Figura 6 – Avaliação da gordura visceral em camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica. Os valores foram considerados significativos para * $p < 0.05$.

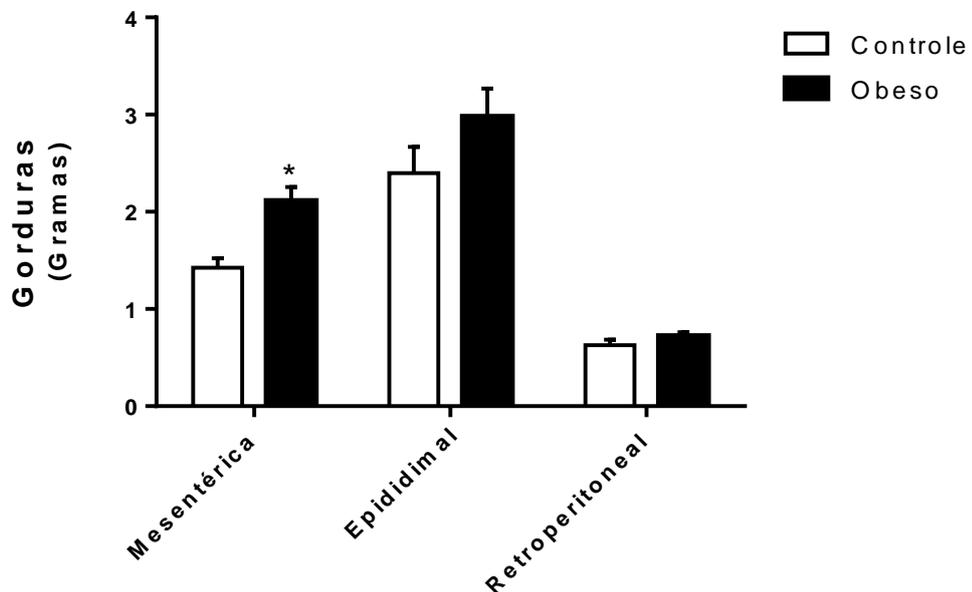


Figura 7 – Avaliação das gorduras mesentérica, epididimal e retroperitoneal em camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica. Os valores foram considerados significativos para * $p < 0.05$.

5.2 AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Os animais do grupo obeso apresentaram aumento significativo nos níveis de IL-1 β , no hipocampo, estriado e no pré-frontal, quando comparado aos controles (Figura 8). Os níveis de TNF- α (Figura 9), apresentou aumento significativo no estriado e no hipocampo dos animais obesos, quando comparado ao controle. A presença de IL-1 β e TNF- α , citocinas pró inflamatórias, demonstra que um processo de inflamação está instalado nos tecidos. Na avaliação dos níveis de IL-10 (Figura 10), apenas no estriado ocorreu aumento significativo no grupo obeso, podendo ser relacionado a um desenvolvimento de resposta anti-inflamatória.

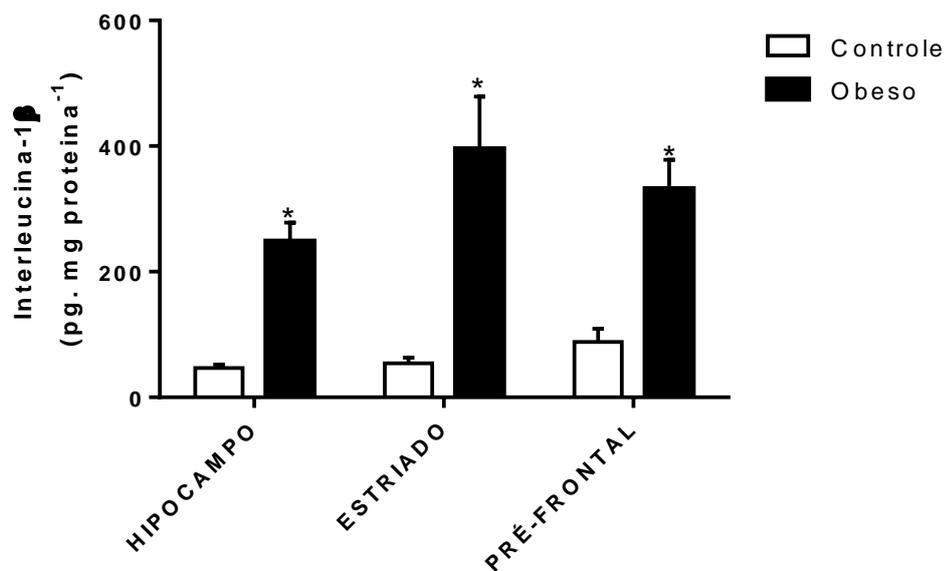


Figura 8 – Avaliação dos níveis de Interleucina-1 β no hipocampo, estriado e pré-frontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica.

Os valores foram considerados significativos para * $p < 0.05$.

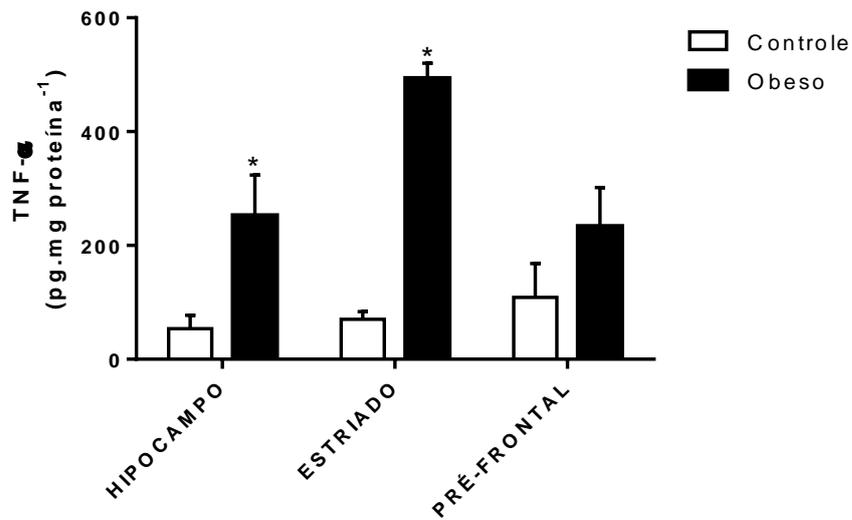


Figura 9 – Avaliação dos níveis de TNF- α no hipocampo, estriado e pré-frontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica. Os valores foram considerados significativos para * $p < 0.05$.

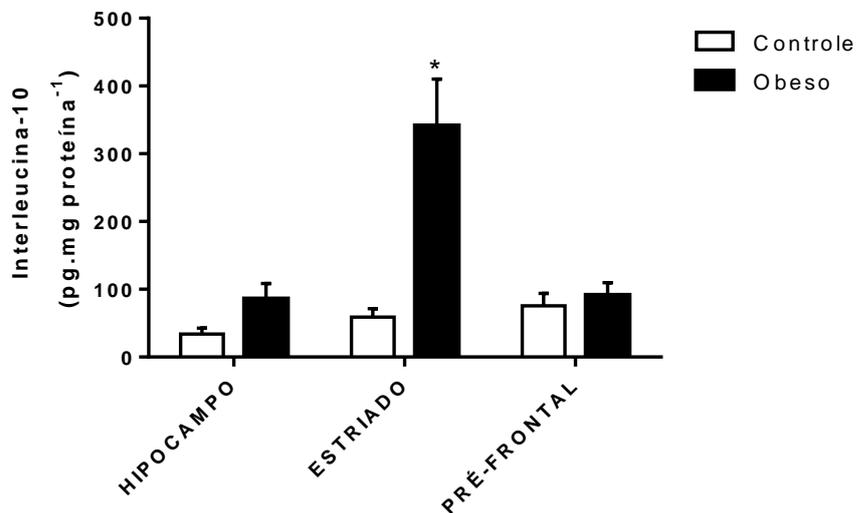


Figura 10 – Avaliação dos níveis de Interleucina-10 no hipocampo, estriado e pré-frontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica. Os valores foram considerados significativos para * $p < 0.05$.

5.3 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Para avaliação de estresse oxidativo, avaliou-se dano a lipídeos e a proteínas no hipocampo, estriado e no pré-frontal. A avaliação de dano a lipídeos se deu através da verificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Figura 11), sendo encontrado aumento significativo no hipocampo dos animais obesos, comparadas ao controle. O dano a proteínas foi avaliado pela formação de proteínas carboniladas (Figura 12), mostrando aumento significativo no hipocampo e no estriado dos animais obesos.

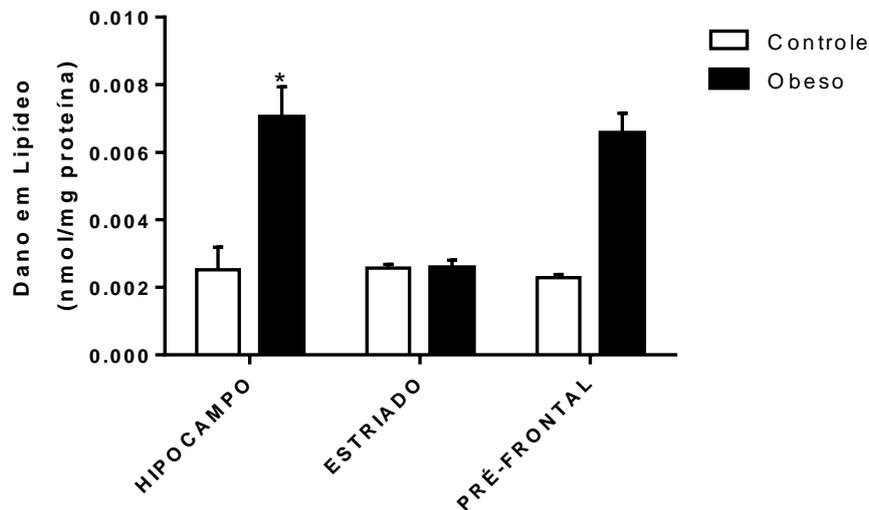


Figura 11 – Avaliação do dano em lipídeos no hipocampo, estriado e pré-frontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica. Os valores foram considerados significativos para * $p < 0.05$.

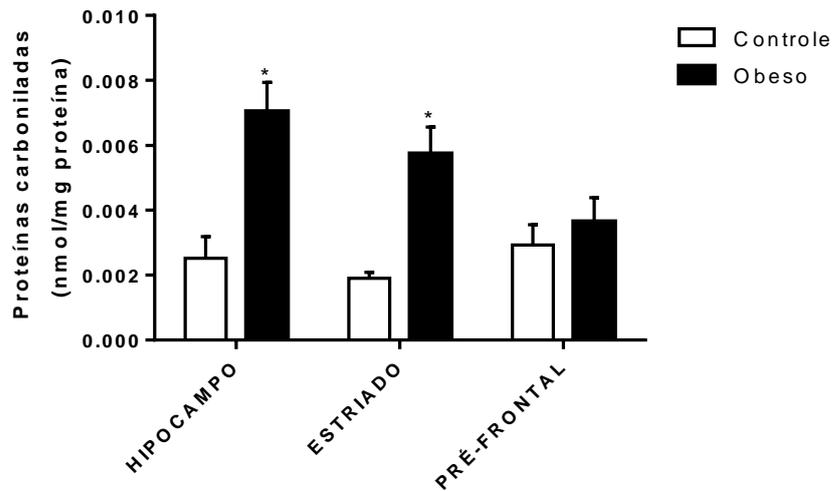


Figura 12 – Avaliação do dano em proteínas no hipocampo, estriado e pré-frontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica. Os valores foram considerados significativos para * $p < 0.05$.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Na avaliação da atividade de SOD (Figura 13) não foi observado diferença entre os grupos obesos e controle nas estruturas analisadas. A atividade da CAT (Figura 14), foi observado aumento significativo no pré-frontal e uma inibição significativa da sua atividade no hipocampo dos animais que receberam dieta hiperlipídica.

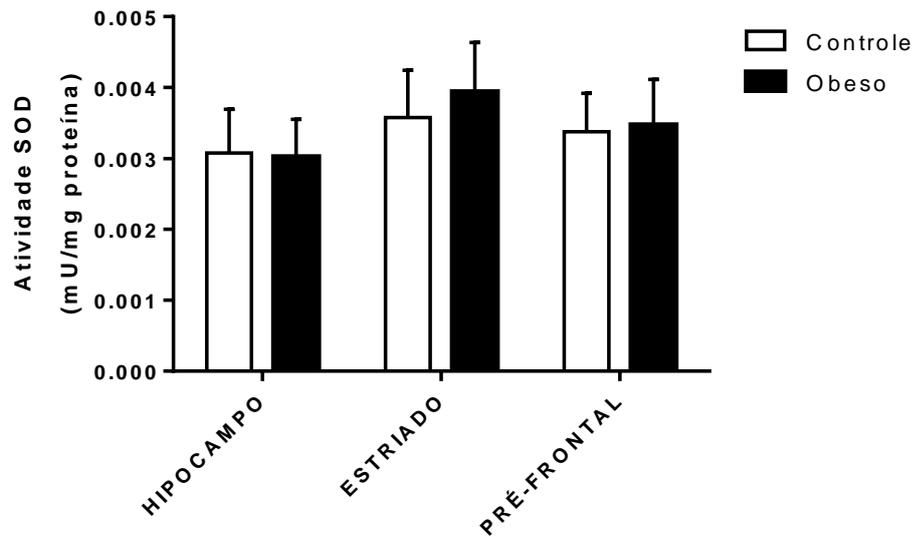


Figura 13 - Avaliação da atividade da enzima antioxidante SOD no hipocampo, estriado e pré-frontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica. Os valores foram considerados significativos para * $p < 0.05$.

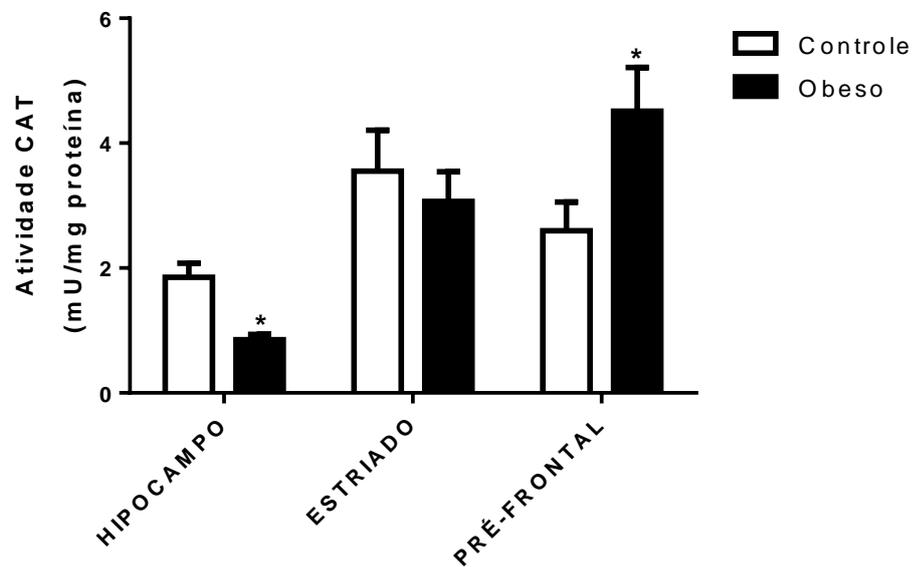


Figura 14 – Avaliação da atividade da enzima antioxidante CAT no hipocampo, estriado e pré-frontal de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta hiperlipídica. Os valores foram considerados significativos para * $p < 0.05$.

6. DISCUSSÃO

A obesidade é vista como um estado de baixo grau de inflamação crônica sistêmica, caracterizada como uma inflamação metabólica, pois é resultado de anormalidades homeostáticas e não causada por um patógeno^{61,138,139}. Estudos demonstram que o consumo excessivo de nutrientes pode de forma rápida ativar respostas inflamatórias através da expressão de citocinas^{70,81}. Esse mecanismo pode ser observado no tecido adiposo, bem como no hipotálamo e outras estruturas do SNC^{61,70, 81, 138,139, 140,141}.

A fim de investigar o envolvimento da obesidade no comprometimento cognitivo, o presente estudo avaliou parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em estruturas relacionadas com a função cognitivas de animais submetidos a modelo de obesidade. Na tabela 3 está apresentado o resumo dos resultados encontrados, que serão discutidos posteriormente.

Tabela 3 - Resumo dos resultados.

Estruturas	Marcadores Inflamatórios			Marcadores de Estresse Oxidativo		Enzimas Antioxidantes	
	TNF- α	IL-1 β	IL-10	TBARS	CARBONIL	SOD	CAT
Hipocampo	↑	↑	-	↑	↑	-	↓
Estriado	↑	↑	↑	-	↑	-	-
Córtex pré-frontal	-	↑	-	↑	-	-	↑

O presente estudo identificou a presença de processo inflamatório instalado no hipocampo e no estriado dos animais que receberam dieta hiperlipídica, através da expressão de citocinas pró-inflamatórias, no entanto o córtex pré-frontal apresentou

um início para este processo. Está diferença no processo de inflamação nos tecidos avaliados se deu pela disparidade na expressão de citocinas.

Quando avaliado as estruturas individualmente quando ao processo inflamatório, pode-se descrever que o hipocampo dos animais apresentou um processo inflamatório instalado pela expressão IL-1 β e TNF- α , citocinas pró-inflamatórias, e que não houve o desenvolvimento de uma atividade anti-inflamatória, pois não ocorreu a expressão de uma das principais citocinas com esta atividade a IL-10. Na avaliação do estriado foi identificado um perfil diferente, pois ocorreu a expressão IL-1 β e TNF- α acompanhado da IL-10, podendo caracterizar que neste tecido também ocorreu um processo inflamatório, porem este conseguiu desenvolver uma resposta com a expressão de IL-10 para defesa. No córtex pré-frontal foi identificado a expressão de IL-1 β , importante citocina que está envolvida no processo de instalação da inflamatória, caracterizando um início deste processo neste tecido. A identificação do processo inflamatório nestas estruturas sugere que animais submetidos a indução de obesidade por dieta hiperlipídica podem desenvolver déficit cognitivo, pois hipocampo, estriado e córtex pré-frontal são estruturas fortemente interligadas e podem sofrer danos ligados a instalação de inflamação levando a comprometimento nas suas funções¹⁴².

É importante destacar que o processo de inflamação já vem sendo bem descrito quanto a sua presença no tecido adiposo e também em outras estruturas do sistema nervoso, como o hipotálamo, sendo que a presença de inflamação neste tecido pode estar relacionada a migração das citocinas pró-inflamatórias para outros tecidos, como o hipocampo, o estriado e o córtex pré-frontal. Milanski e colaboradores¹⁴³, mostraram que ácidos graxos com cadeia saturada também são capazes de ativar receptores do tipo Toll-like (TLR4, do inglês Toll-like receptor 4) no hipotálamo. Estudos destacam que a ativação do TLR4 tem a capacidade de iniciar a via de sinalização do NF κ B, o que aumenta a expressão de citocinas pró inflamatórias (IL-6 e TNF- α)^{143, 144, 145}. Diversos estudos observaram a ativação do receptor TLR4 no hipotálamo^{96,146,147, 148}. Pode-se então sugerir que a dieta com alto teor de gordura consumida pelos animais do presente estudo, tenham iniciado a ativação dessa cascata de mediadores inflamatórios, culminado na expressão das citocinas IL-6, IL1- β , conforme foi observado por outros autores^{96,146,147,148}. Além do hipotálamo, outros tecidos do SNC vêm sendo descritos como afetados pelo processo inflamatório desenvolvido na obesidade^{149,150,151}.

Diversos fatores podem estar relacionados a presença de inflamação no sistema nervoso central de animais submetidos a modelo de obesidade. Um deles é a alteração na permeabilidade da barreira hematoencefálica que pode estar relacionada com os efeitos prejudiciais de consumo dieta ocidental na função cognitiva, aumentando ainda mais a vulnerabilidade do hipocampo a fatores dietéticos e metabólicos^{152,153}. Há evidências de que a elevação de citocinas pró-inflamatórias na periferia possam migrar para o SNC, quando ocorre comprometimento da barreira hematoencefálica, fazendo com que o cérebro fique mais acessível para estes agentes inflamatórios^{149,154}.

O estudo de Dinel e colaboradores¹⁵⁰, buscou evidências para identificar se o aumento da prevalência de alterações comportamentais na síndrome metabólica também está associado com inflamação central, avaliando comportamentos emocionais e de memória, bem como os níveis plasmáticos no hipocampo e no hipotálamo de citocinas inflamatórias. Os autores encontraram níveis de citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) aumentadas no hipocampo, além de aumento comportamentos de ansiedade e memória de reconhecimento prejudicada. Através dos resultados obtidos os autores concluíram que a inflamação do hipocampo é um importante fator na fisiopatologia das complicações neuropsiquiátricas, pois o hipocampo é uma área cerebral fundamental para o controle de comportamentos emocionais e cognitivos.

Estudos que utilizaram modelo de obesidade induzida por dieta relatam que este tipo de dieta é capaz levar a um aumento de citocinas pró inflamatórias no cérebro e na periferia, principalmente IL-6, TNF- α ^{84,155} e IL1- β ¹⁵⁵. O estudo de Pistell, 2010⁸⁴, após avaliar a capacidade cognitiva e marcadores bioquímicos de inflamação cerebral em animais que receberam dieta com elevado teor de gordura e dieta ocidental, sugeriram a ligação entre a obesidade induzida por dieta, inflamação cerebral e comprometimento cognitivo. Liu e colaboradores¹⁵⁶, tiveram como objetivo investigar o potencial mecanismo de efeitos protetores da luteolina no comprometimento cognitivo induzida pela obesidade, mostraram na análise dos parâmetros inflamatórios, que os níveis de TNF- α e IL-6 tiveram aumento significativo no hipocampo e no córtex dos animais que receberam dieta rica em gordura.

No entanto o estudo de Baumgarner e colaboradores¹⁴¹, que avaliou se obesidade induzida por dieta afeta o desempenho cognitivo em relação a neuroinflamação, nas amostras de hipocampo e córtex, observou que a dieta não

influenciou a resposta inflamatória nestes tecidos, e que os défices cognitivos associados com obesidade induzida por dieta podem ser relacionados com um reduzido suporte neurotrófico. Diversos estudos relatam sobre a variação dos níveis de citocinas inflamatórias, que podem estar relacionadas a diferença entre a idade dos animais estudados, pois a modelos de obesidade induzida por dieta que utilizam animais com 3 semanas¹⁵¹, 14 semanas¹⁴¹, 12 meses⁸⁴. Além da idade dos animais esta discrepância entre os resultados pode se ocorrer pela diferença nas espécies e no tipo de dieta¹⁵⁷.

O presente estudo também avaliou a presença de estresse oxidativo no SNC através da análise de dano a proteínas e a lipídeos em relação a exposição a dieta hiperlipídica, sendo que foi identificado aumento de dano a proteínas no hipocampo e no córtex pré-frontal e dano a lipídeos somente no hipocampo. Quando avaliada a defesa antioxidante nestes tecidos obtivemos as seguintes respostas, diminuição da atividade de CAT no hipocampo e aumento da sua atividade no córtex pré-frontal. A atividade da SOD, não apresentou diferença entre o grupo que recebeu dieta controle e hiperlipídica. O estriado não apresentou diferença entre os grupos nos parâmetros analisados para estresse oxidativo e defesa antioxidante. Podendo descrever que no hipocampo a presença do processo inflamatório pode ter levado ao dano em lipídeos e proteínas e este tentou desenvolver uma defesa que não foi satisfatória. No estriado a inflamação instalada juntamente o a presença de citocinas anti-inflamatórias, podem ter levado a um dano mais discreto ocorrendo somente danos a proteína, sem desenvolvimento de defesa antioxidante. No córtex pré-frontal foi identificado a presença de IL-1 β , sugestivo para um início de inflamação, que pode estar relacionada ao dano a lipídeos encontrado, porém como o processo de inflamação instalado pode ainda ser inicial a defesa antioxidante consegue se desenvolver.

Existem vários mecanismos que podem justificar a presença de estresse oxidativo na obesidade. O estado de inflamação crônica instalado em indivíduos obesos é o principal mecanismo de estresse oxidativo, pois as citocinas pró inflamatórias, especialmente TNF- α ¹⁵⁸, são potentes estimuladores para a produção de espécies reativas de oxigênio. Estão envolvidos outros mecanismos na presença de estresse oxidativo, como a oxidação de ácidos graxos, o aumento no consumo de oxigênio, que gera radicais livres na cadeia respiratória mitocondrial, a ocorrência de danos celulares causado pelo excesso de acúmulo de gordura e o tipo de dieta, pois dietas ricas em gordura podem alterar o metabolismo do oxigênio^{98,159,160}. Após o

aumento de tecido adiposo, a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), apresentam-se significativamente diminuídas^{98,161,162}. A avaliação da atividade da SOD e CAT no hipocampo e no córtex pré-frontal, não mostrou alteração pela exposição a dieta rica em gordura¹⁶³.

7. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados podem sugerir que a presença do processo inflamatório sistêmico, já descrito por outros autores, está relacionado ao aumento de citocinas inflamatórias na periferia que podem contribuir para inflamação central e consequente dano oxidativo em animais obesos. Pode-se sugerir, que a inflamação central quando instalada no hipocampo, córtex pré-frontal e estriado pode contribuir para danos cognitivos relacionado a obesidade.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization, WHO [internet]. Obesity and overweight. [Atualizada em 2014 Ago; acesso: 2014 Out 24]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
2. Oliveira AMA, Cerqueira EMM, Souza JS, Oliveira AC. Sobrepeso e obesidade infantil: influência de fatores biológicos e ambientais em Feira de Santana, BA. *Arq Bras End e Metab*, 2003 abr; 47(2): 144-150.
3. Sandal-Lee SV, Velloso LA. Disfunção hipotalâmica na obesidade. *Arq Bras End Metab*, 2012; 56 (6): 341-350.
4. Hernández HR, Mendía LES, Ramírez GR, Reyes MAR. Obesity and Inflammation: Epidemiology, Risk Factors, and Markers of Inflammation. *Int J Endocrinol*. 2013; 2013: 1-11.
5. Elias MF, Elias PK, Sullivan LM, Wolf PA, D'Agostino RB. Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart Study. *Neurobiol. Aging*. 2005; 26: S11–S16.
6. Sabia S, Kivimaki M, Shipley MJ, Marmot MG, Singh-Manoux A. Body mass index over the adult life course and cognition in late midlife: the Whitehall II Cohort Study. *Sou. J. Clin. Nutr.* 2009; 89 (2): 601-607.
7. Cournot M, Marquie JC, Ansiau D, Martinaud C, Fonds H, Ferrieres J, et al. Relation between body mass index and cognitive function in healthy middle-aged men and women. *Neurology*. 2006; 67 (7):208-214
8. Miller AA, Spencer SJ. Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2014; 42: 10–21.
9. Bahia LR., Araújo DV. Impacto econômico da obesidade no Brasil. *Rev. HUPE*. 2014;13(1):13-17.
10. Velloso LA, Schwartz MW. Altered Hypothalamic Function in Diet Induced Obesity. *Int J Obes. Lond*, 2011; 35(12): 1455–1465.
11. Ramachandrappa S, Farooqi S. Genetic approaches to understanding human obesity. *J Clin Invest*. 2011; 121(6): 2080-2086.
12. Hirai S, Takahashi N, Lin S, Kawada R. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediadores Inflamm*. 2010; 2010: 367838.

13. Kalmijn S. Fatty acid intake and the risk of dementia and cognitive decline: a review of clinical and epidemiological studies. *J Nutr Health Aging*. 2000; 4(4):202-207.
14. Uranga RM, Bruce-Keller AJ, Morrison CD, Fernandez-Kim SO, Ebenezer PJ, Zhang L, et al. Intersection between metabolic dysfunction, high fat diet consumption, and brain aging. *J Neurochem*. 2010;114(2):344-61.
15. Uranga RM, Keller JN. Diet and age interactions with regards to cholesterol regulation and brain pathogenesis. *Curr Gerontol Geriatr Res*. 2010; 2010: 1-14.
16. McNeilly AD, Williamson R, Sutherland C, Balfour DJ, Stewart CA. High fat feeding promotes simultaneous decline in insulin sensitivity and cognitive performance in a delayed matching and non-matching to position task. *Behav Brain Res*. 2011; 217(1):134-41.
17. 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):1085-8.
18. Morrison CD, Pistell PJ, Ingram DK, Johnson WD, Liu Y, Fernandez-Kim SO, et al. High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling. *J Neurochem*. 2010; 114(6):1581-9.
19. Vachharajani V, Granger DN. Adipose tissue: A motor for the inflammation associated with obesity. *IUBMB Life*. 2009; 61(4): 424-430.
20. Rupérez AI, Gil A, Aguilera CM. Genetics of Oxidative Stress in Obesity. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(2): 3118–3144.
21. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr., Campinas*, 2010; 23(4):629-643.
22. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*, 1997; 43(1): 61-8.
23. Esteves PFCSS. Obesidade – Revisão bibliográfica [Dissertação]. Covilhã: Universidade da Beira Interior, Mestrado em Medicina; 2011. 55f.
24. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010. São Paulo: ABESO; 2009.
25. Rivera P, Martín MP, Pavón FJ, Serrano A, Crespillo A, Cifuentes M, et al. Pharmacological Administration of the Isoflavone Daidzein Enhances Cell Proliferation and Reduces High Fat Diet-Induced Apoptosis and Gliosis in the Rat Hippocampus. *PLoS One*. 2013; 8(5): e64750.

26. World Obesity [internet]. World map of obesity. [acesso: 2014 Out 24]. Disponível em: <http://www.worldobesity.org/aboutobesity/world-map-obesity/>.
27. Malta DC, Andrade SC, Claro RM, Bernal RTI, Monteiro CA. Evolução anual da prevalência de excesso de peso e obesidade em adultos nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal entre 2006 e 2012. *Rev. Bras Epidemiol*, 2014; 267-276.
28. BRASIL [internet]. Ministério da Saúde. VIGITEL Brasil 2014: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico [acesso em 19 jul. 2015]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/30/Lancamento-Vigitel-28-04ok.pdf>
29. Rosa MI, Silva FML, Girolodi SB, Antunes GN, Wedland EM. Prevalência e fatores associados à obesidade em mulheres usuárias de serviços de pronto-atendimento do Sistema Único de Saúde no sul do Brasil. *Ciênc. saúde colet.* 2011; 16(5): 2559-2566.
30. Souza TF, Nahas MV, Silva DAS, Duca GFD, Peres MA. Fatores associados à obesidade central em adultos de Florianópolis, Santa Catarina: estudo de base populacional. *Rev. bras. epidemiol.* 2011; 14(2): 296-309.
31. Pauli JR. Obesidade e diabetes: bases moleculares da etiopatogenia. In: Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR. *Obesidade e diabetes: fisiopatologia e sinalização celular*. 1ª edição. São Paulo: Sarvier; 2011. p. 74-99.
32. Coutinho W, Dualib P. Etiologia da obesidade. In: Nunes MA, Appolinario JC, Galvão AL, Coutinho W. *Transtornos alimentares e obesidade*. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed; 2006. p. 265-272.
33. Ye J, McGuinness OP. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 304 (5): E466-E477.
34. Torsoni MA. Bioquímica da obesidade. In: Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR. *Obesidade e diabetes: fisiopatologia e sinalização celular*. 1ª edição. São Paulo: Sarvier; 2011. p. 36-73.
35. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:327-32.
36. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50 (2): 216-29.
37. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6 (10):772-83.

38. Varman TS, Kitt FP, Gerald IS. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. 2010; 375(9733): 2267–77.
39. Halberg N, Wernstedt I, Scherer PE. The Adipocyte as an Endocrine Cell. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008 Set;37(3):753-68.
40. Ye J, McGuinness OP. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013; 304(5): E466–77.
41. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(4): E1118-28.
42. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007; 117 (1): 175-184.
43. Puig KL, Floden AM, Adhikari R, Golovko MY, Combs CK. Amyloid precursor protein and proinflammatory changes are regulated in brain and adipose tissue in a murine model of high fat diet-induced obesity. *PLoS One*. 2012;7(1): e30378.
44. Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, D Li, Xu J, McNelis J, M Lu, Li P, Q Yan, Zhu Y, Ofrecio J, Lin M, Brenner MB, Olefsky JM. Neutrophils measure insulin resistance in mice fed a diet rich in fat elastase secreted by. *Nat Med*. 2012; 18: 1407-1412.
45. Olefsky, JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72: 219-246.
46. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11: 98-107.
47. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003; 112 (12): 1796-808.
48. Exley MA, Hand L, O'Shea D, Lynch L. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *J Endocrinol*. 2014 Nov;223(2): R41-8.
49. Lumeng CN1, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-84.
50. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM.. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*. 2008; 118 (9): 2992-3002.
51. Odegaard JI, Chawla A. Alternative Macrophage Activation and Metabolism. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6: 275–297.

52. Huh JY, Park YJ, Ham M, Kim JB. Crosstalk between Adipocytes and Immune Cells in Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysregulation in Obesity. *Mol Cells*. 2014 Mai; 37(5): 365–371
53. Patel PS, Buras ED, Balasubramanyam A. The Role of the Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *J Obes*. 2013; 2013: 616193.
54. Ye J. Adipose tissue vascularization: its role in chronic inflammation. *Curr Diabet Reports*. 2011; 11(3): 203-210, 2011.
55. Valles AA, Inoue W, Rummel C, Luheshi GN. Obesity, adipokines and neuroinflammation. *Neuropharmacology*. 2015 Sep;96(Pt A):124-34.
56. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000 Jul;106(2):171-6.
57. Hirabara SM, Gorjão R, Vinolo MA, Rodrigues AC, Nachbar RT, Curi R. Molecular Targets Related to Inflammation and Insulin Resistance and Potential Interventions. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 379024.
58. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Nov; 116(11): 3015–3025.
- 59 Poulain-Godefroy O, Bacquer OL, Plancq P, Lecœur C, Pattou F, Frühbeck G, et al. Inflammatory Role of Toll-Like Receptors in Human and Murine Adipose Tissue. *Mediators Inflamm*. 2010; 2010: 823486.
60. Martins AR1, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, Cury-Boaventura MF, Silveira LR, Curi R, Hirabara SM. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis*. 2012. 23;11:30.
61. Itoh M, Suganami T, Hachiya R, Ogawa Y. Adipose Tissue Remodeling as Homeostatic Inflammation. *Int J Inflamm*. 2011; 2011: 720926.
62. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. JM.A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2007;282(48):35279-92.
63. Fessler M B, Rudel L L, Brown M. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*. 2009; 20(5): 379–385.
64. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Jan;27(1):84-91.

65. BROOKS C. The hypothalamus and obesity. *Med J Aust.* 1948; 1: 327-331.
66. Kennedy GC. Experimental hypothalamic obesity. *Proc R Soc Med.* 1951; 44: 899-902.
67. Sunderman FW, Haymaker W. Hypothermia and elevated serum magnesium in a patient with facial hemangioma extending into the hypothalamus. *Am J Med Sci.* 1947; 213 (5): 562-571.
68. Konner AC, Klockener T, Bruning JC. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav* 2009; 97: 632–638.
69. Smeets PA, Charbonnier L, Van Meer F, Van der Laan LN, Spetter MS. Food-induced brain responses and eating behaviour. *Proc Nutr Soc.* 2012 Nov;71(4):511-20.
70. Simpson KA, Martin NM, Bloom SR. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009 Mar;53(2):120-8.
71. Mosca PRF, Silveira PP. Obesidade e o hipotálamo. *Revista HCPA.* 2013;33 (3/4):248-256.
72. Berthoud HR, Morrison C. The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol.* 2008;59: 55-92.
73. Damiani D, Damiani D. Sinalização cerebral do apetite. *Rev Bras Clin Med.* 2011 mar-abr; 9(2):138-45.
74. Thaler JP, Schwartz MW. Mini-review: Inflammation and Obesity Pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology.* 2010; 151 (9): 4109-4115.
75. Faloia E, Michetti G, de Robertis M, Luconi MP, Furlani G, Boscaro M. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism.* 2012; 2012: 1-7.
76. Landeiro FM, Quarantini LG. Obesidade: Controle Neural e Hormonal do Comportamento Alimentar. *Rev. Cien. med. biol.* 2011 set./dez; 10(3):236-245.
77. Egecioglu E, Skibicka KP, Hansson C, Alvarez-Crespo M, Friberg PA, Jerlhag E, et al. Hedonic and incentive signals for body weight control. *Rev Endocr Metab Disord.* 2011 Sep;12(3):141-51.
78. Kenny PJ. Reward Mechanisms in Obesity: New Insights and Future Directions. *Neuron.* 2011; 69 (4): 664-679.

79. Guyenet SJ, Schwartz MW. Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Body Fat Mass: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97 (3): 745-755.
80. Rui L. Brain Regulation of energy balance and body weights. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013; 14 (4): 1-35.
81. Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR. Obesity and Appetite Control. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012: 824.305.
82. Sescousse G, Redouté J, Dreher JC. The architecture of reward value coding in the human orbitofrontal cortex. *J Neurosci.* 2010;30(39):13095-104.
83. Nummenmaa L, Hirvonen J, Hannukainen JV, 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.
84. 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(1-2): 25–32.
85. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 415 – 445.
86. Heisler LK, 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, Baltimore.* 2007 Jun; 27(26): 6956-6964.
87. Grabenhorst F, Rolls ET, Bilderbeck A. How cognition modulates affective responses to taste and flavor: top-down influences on the orbitofrontal and pregenual cingulate cortices. *Cereb. Cortex, New York.* 2008 Jul; 18(7):1549-1559.
88. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259 (5091): 87-91.
89. Ghigliotti G, Barisione C, Garibaldi S, Fabbi P, Brunelli C, Spallarossa P. et al. Adipose Tissue Immune Response: Novel Triggers and Consequences for Chronic Inflammatory Conditions. *Inflammation.* 2014; 37(4): 1337-1353.
90. Pietiläinen KH, Róg T, Laakso, TS, Virtue S, Gopalacharyulu P, Tang J, et al. Association of lipidome remodeling in the adipocyte membrane with acquired obesity in humans. *PLoS Biol.* 2011; 9 (6): 1-14.
91. Ye J, Gao Z, Yin J, Ele H. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob / ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293 (4): E1118-E1128.

92. Ye J. Emerging Role of Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Insulin Resistance. *Int J Obes*. 2009; 33 (1): 54-66.
93. Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One*. 2009; 4 (4): e5045.
94. Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci*. 1998;23:74-79.
95. Kim O, Jun W, Lee J. Mechanism of ER Stress and Inflammation for Hepatic Insulin Resistance in Obesity. *Ann Nutr Metab* 2015;67:218–227.
96. Maric T, Woodsideb B, Luheshia GN. The effects of dietary saturated fat on basal hypothalamic neuroinflammation in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2014; 36: 35–45.
97. 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):153-162.
98. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int J Mol Sci*. 2011; 12(5): 3117–3132.
99. Huang C, McAllister MJ, Slusher AL, Webb HE, Mock JT, Acevedo EO. ObesityRelated Oxidative Stress: the Impact of Physical Activity and Diet Manipulation. *Sports Med Open*. 2015; 1(1): 32.
100. Korda M, Kubant R, Patton S, Malinski T. Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H1514–H21
101. Wannamethee SG, Tchernova J, Whincup P, Lowe G, Kelly A, Rumley A, et al. Plasma leptin: associations with metabolic, inflammatory and haemostatic risk factors for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2007;191:418–26.
102. Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, et al. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 2009;116:219–30.
103. Mammucari C, Rizzuto R. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mech Ageing Dev*. 2010;131(7-8):536-43.
104. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*. 1997; 43(1): 61-8.
105. Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species and endothelial function—role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;110:87–94.

106. Kunwar A, Priyadarsini K. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J Med Allied Sci.* 2011; 1: 53–60.
107. Rover Jr L, Hoehr NF, Vellasco AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím Nova.* 2001; 24(1): 112-9.
108. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114:1752–1761.
109. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, Megías-Vericat J, Tortajada-Girbés M, Alonso-Iglesias E. Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation. *Atherosclerosis.* 2011;2215:475–480.
110. Chan RS, Woo J. Prevention of overweight and obesity: How effective is the current public health approach. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2010;7:765–783.
111. Ozgen IT, Tascilar ME, Bilir P, Boyraz M, Guncikan MN, Akay C, Dundaroz R. Oxidative stress in obese children and its relation with insulin resistance. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2012;25:261–266.
112. Rupérez AI, Olza J, Gil-Campos M, Leis R, Mesa MD, Tojo R, et al. Are Catalase -844A/G Polymorphism and Activity Associated with Childhood Obesity? *Antioxid. Redox Signal.* 2013;19:1970–1975.
113. Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 2004;114:1752– 1761.
114. Franca BK, Alves MRM, Souto FMS, Tiziane L, Boaventura RF, Guimarães A, Alves A. Peroxidación lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *GE J Port Gastrenterol.* 2013;20(5):199-206.
115. Gorospe EC, Dave JK. The risk of dementia with increased body mass index. *Age and Ageing.* 2007; 36: 23-29.
116. Beydoun MA, Beydoun HA, Wang Y. Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: A systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev.* 2008; 9(3): 204-218.
117. Anstey KJ, Cherbuin N, Budge M, Young J. Body mass index in midlife and later life as a risk factor for dementia: A meta-analysis of prospective studies. *Obes. Rev.* 2011; 12 (5): E426-e4.

118. Cournot M, Marquie JC, Ansiau D, Martinaud C, Fonds H, Ferrieres J, et al. Relation between body mass index and cognitive function in healthy middle-aged men and women. *Neurology*. 2006; 67 (7): 1208-1214.
119. Sabia S, Kivimaki M, Shipley MJ, Marmot MG, Singh-Manoux A. Body mass index over the adult life course and cognition in late midlife: The Whitehall II Cohort Study. *Sou. J. Clin. Nutr.* 2009; 89 (2): 601-607.)
120. Ward MA, Carlsson CM, Trivedi MA, Sager MA, Johnson SC. The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study. *BMC Neurol.* 2005; 5: 23
121. Taki Y, Kinomura S, Sato K, Inoue K, Goto R, Okada K, et al. Relationship between body mass index and gray matter volume in 1428 healthy individuals. *Obesity*. 2008; 16 (1):119–124.
122. Raji CA, Ho AJ, Parikshak NN, Becker JT, Lopez OL, Kuller LH, et al. Brain structure and obesity. *Hum. Brain Mapp.* 2010; 31 (3):353–364.
123. Fotuhi M, Do D, Jack C. Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. *Nat. Rev. Neurol.* 2012; 8 (4): 189–202.
124. Brooks SJ, Benedict C, Burgos J, Kempton MJ, Kullberg J, Nordenskjold R, et al. Late-life obesity is associated with smaller global and regional gray matter volumes: a voxel-based morphometric study. *Int. J. Obes.* 2013; 37 (2): 230–236.
125. Pannacciulli N, Del Paris A, Chen K, Le DS, Reiman EM, Tataranni PA. Brain abnormalities in human obesity: A voxel-based morphometric study. *NeuroImage.* 2006; 31 (4): 1419-1425.
126. Spencer SJ. Perinatal nutrition programs neuroimmune function long-term: mechanisms and implications. *Front. Neurosci.* 2013; 7: 144.
127. Koessler S, Engler H, Riether C, Kissler J. No retrieval-induced forgetting under stress. *Psychol. Sci.* 2009; 20 (11): 1356–1363.
128. Spencer SJ, Tilbrook A. The glucocorticoid contribution to obesity *Stress*. 2011; 14 (3): 233–246.
129. MacQueen G, Frodl T. The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research?. *Mol. Psychiatry.* 2011; 16 (3): 252-264
130. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA. Brasília/DF – 2013.

131. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One*. 2012;7(1):e30571.
132. Razolli DS, Moraes JC, Morari J, Moura RF, Vinolo MA, Velloso LA. TLR4 expression in bone marrow-derived cells is both necessary and suficiente to produce the insulin resistance phenotype in diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2015;156(1):103-13.
133. 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 Pt 2):R1704-8.
134. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. *Met Enzymol*. 1990;186:421-31.
135. Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol*. 1990;186:464-478.
136. Aebi H. Catalase in vitro. *Met Enzymol*. 1984;105:121-26.
137. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Anal Biochem*. 1987; 32:279-312.
138. Cai D. Neuroinflammation in overnutrition-induced diseases. *Vitam Horm*. 2013; 91: 195-218.
139. Cai D, Liu T. Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1243: E1-39.
140. Spagnuolo MS, Mollica MP, Maresca B, Cavaliere G, Cefaliello C, Trinchese G, Scudiero R, Crispino M, Cigliano L. High Fat Diet and Inflammation - Modulation of Haptoglobin Level in Rat Brain. *Front Cell Neurosci*. 2015; 9: 479.
141. Baumgarner KM, Setti S, Diaz C, Littlefield A, Jones A, Kohman RA. Dietinduced obesity attenuates cytokine production following an immune challenge. *Behav Brain Res*. 2014; 267: 33-41.
142. Dagher A. The neurobiology of appetite: hunger as addiction. *Int J Obes (Lond)*. 2009 Jun;33 Suppl 2:S30-3.
143. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R., Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME. 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: 359-70.

144. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D (2008) Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 135: 6173
145. Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Baskin DG, Heinecke JW, Woods SC, Schwartz MW, Niswender KD. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 296: E1003–E1012.
146. Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC, Caris AV, Pinheiro F, Ribeiro EB, Nascimento CMO, Oyama LM. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. *J Nutr Biochem*. 2013; 24:809-18.
147. Wang X, Ge A, Cheng M, Guo F, Zhao M, Zhou X, Liu L, Yang N. Increased hypothalamic inflammation associated with the susceptibility to obesity in rats exposed to high-fat diet. *Exp Diabetes Res*. 2012; 2012: 847246.
148. Okuda MH, Zemdegs JC, Santana AA, Santamarina AB, Moreno MF, Hachul AC, Santos B, Nascimento CM, Ribeiro EB, Oyama LM. Green tea extract improves high fat diet-induced hypothalamic inflammation, without affecting the serotonergic system. *J Nutr Biochem*. 2014; 25:1084-9.
149. Davidson TL, Monnot A, Neal AU, Martin AA, Horton JJ, Zheng W. The Effects of a High-energy Diet on Hippocampal-dependent Discrimination Performance and Blood-brain Barrier Integrity Differ for Diet-induced Obese and Diet-Resistant Rats. *Physiol Behav*. 2012; 107(1): 26–33.
150. 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.
151. Lavin DN, Joesting JJ, Chiu GS, Moon ML, Meng J, Dilger RN, Freund GG. Fasting induces an anti-inflammatory effect on the neuroimmune system which a high-fat diet prevents. *Obesity (Silver Spring)*. 2011; 19(8): 1586–1594.
152. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006;1(3):223-36.
153. Kanoski SE, Davidson TL. Western Diet Consumption and Cognitive Impairment: Links to Hippocampal Dysfunction and Obesity. *Physiol Behav*. 2011; 103(1): 59–68.
154. Fung A, Vizcaychipi M, Lloyd D, Wan Y, Ma D. Central nervous system inflammation in disease related conditions: mechanistic prospects. *Brain Res*. 2012;1446:144-55.

155. Thirumangalakudi L, Prakasam A, Zhang R, Bimonte-Nelson H, Sambamurti K, Kindy MS, Bhat NR. High cholesterol- induced neuroinflammation an amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *J Neurochem.* 2008; 106(1): 475–485.
156. Liu Y, Fu X, Lan N, Li S, Zhang J, Wang S, Li C, Shang Y, Huang T, Zhang G. Luteolin protects against high fat diet-induced cognitive deficits in obesity mice. *Behav Brain Res.* 2014; 267: 178-88.
157. Boitard C, Cavaroc A, Sauvart J, Aubert A, Castanon N, Layé S, Ferreira G. 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.
158. Chandel NS, Schumacker PT, Arch RH. Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 2001; 276(46):42728-36.
159. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr.* 2007;83(5):S192-203.
160. Khan NI, Naz L, Yasmeen G. Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. *Pak J Pharm Sci.* 2006;19(1):62-5.
161. Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E, Yilmaz MI, Sayal A, Isimer A, Ozdemir IC. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem.* 2002; 35(8):627-31.
162. Lay SL, Simard G, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2014;(5-6):908539.
163. Freeman LR, Zhang L, Nair A, Dasuri K, Francis J, Fernandez-Kim SO, BruceKeller AJ, Keller JN. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. *Free Radic Biol Med.* 2013; 56: 226-33.

ANEXO

ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética



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

Palhoça, 28 de outubro de 2015

Registro na CEUA (código): 15.002.4.01.IV

Ao pesquisador: Gisaine Tezza Rezin; Luana da Rosa Souza

Curso : Medicina - Tubarão

Prezado(a) Pesquisador(a),

Vimos, através deste, informar que o projeto de pesquisa “Avaliação de parâmetros inflamatórios e apoptose em camundongos após indução 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,

Sandro Melim Sgrott

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

Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina

☐ (48) 3279-1038

☐ ceua@unisul.br sandro.sgrott@gmail.com

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

MEIO AMBIENTE