

## OBESIDADE EM RATAS PODE LEVAR À PREJUÍZOS NA MEMÓRIA DE CURTO PRAZO

Julia do Nascimento Panizza (IC) e Miriam Oliveira Ribeiro (Orientadora)

**Apoio:** PIVIC Mackenzie

### RESUMO

A obesidade é o aumento de adiposidade corporal e está diretamente relacionada ao desenvolvimento da Síndrome Metabólica caracterizada pela hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão e pode levar ao desenvolvimento de distúrbios comportamentais, tais como prejuízos na memória, depressão e ansiedade. O presente trabalho teve como objetivo avaliar se a obesidade leva a alterações nos processos de memória, comportamento ansioso e depressivo em ratas tratadas com dieta hiperlipídica (40%) por 35 semanas. Durante esse período foram avaliados ganho de peso corporal, tolerância à glicose e níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides. Posteriormente, submetemos os animais aos testes comportamentais para avaliar a capacidade de locomoção; comportamento depressivo; comportamento ansioso e capacidade de formação de memória. Por fim, foram analisadas as expressões de genes relacionados com a memória no cérebro desses animais por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que as fêmeas obesas não apresentam dificuldades de locomoção, mas apresentam prejuízo na memória de curto prazo. A dificuldade em consolidar memória de curto prazo pode estar relacionada com diminuição na expressão gênica de FGF2 e SGK1, genes reconhecidamente envolvidos na formação de memória. Por outro lado, elas não apresentaram comportamento depressivo nem ansioso. Em conclusão, os achados sugerem que a obesidade em fêmeas leva a prejuízos na formação da memória.

**Palavras-chave:** Obesidade – memória – ansiedade

### ABSTRACT

Obesity is the increase in body adiposity and is directly related to the development of the Metabolic Syndrome characterized by hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia and hypertension and can lead to the development of behavioral disorders such as memory impairment, depression and anxiety. The present study had as objective to evaluate if obesity leads to changes in memory processes, anxiety and depressive behavior in rats treated with a hyperlipid diet (40%) for 35 weeks. During this period, body weight gain, glucose tolerance, and plasma levels of cholesterol and triglycerides were evaluated. Subsequently, we submitted the animals to the behavioral tests to evaluate the locomotion capacity; Depressive behavior;

Anxious behavior and memory training capacity. Finally, the memory-related gene expressions were analyzed in the brains of these animals by real-time PCR. The results showed that obese females do not present difficulties of locomotion, but present short term memory impairment. The difficulty in consolidating short-term memory may be related to a decrease in the gene expression of FGF2 and SGK1 genes known to be involved in memory formation. On the other hand, they did not present depressive or anxious behavior. In conclusion, the findings suggest that obesity in females leads to impairments in memory formation.

**Keywords:** Obesity - memory - anxiety

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade não pode ser definida como uma doença de etiologia única e sim como uma doença multifatorial que culmina em o indivíduo apresentar fenotipicamente um aumento de adiposidade corporal. Esta morbidade pode gerar riscos importantes como o desenvolvimento de outras doenças crônicas não transmissíveis: diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, doenças respiratórias, câncer e doenças cardiovasculares, levando a consequências como a redução da qualidade de vida do indivíduo e até a sua morte prematura.

A partir dos anos 1990 a obesidade começou a ser classificada como uma preocupação mundial, mas devido ao aumento nos níveis de prevalência e permanência descritos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente tornou-se um problema de saúde pública, sendo considerada como uma pandemia atingida por todas as camadas sociais da população.

Sua etiologia é considerada pelos pesquisadores uma das mais complexas, pois o desenvolvimento deste quadro pode ser desencadeado por diversos fatores como genéticos, distúrbios hormonais, distúrbios psicológicos, socioeconômicos, falta da prática de exercícios físicos e má alimentação.

Com relação a alimentação, alguns estudos evidenciam que a ingestão excessiva de açúcares refinados e gorduras saturadas por indivíduos obesos pode levar a disfunções cognitivas que culminam em declínio da aprendizagem.

Desse modo, a hipótese deste trabalho considerou que a obesidade induzida pelo tratamento com dieta hipercalórica a longo prazo poderia estar intimamente associada ao desenvolvimento de distúrbios comportamentais em ratas, destacando-se as alterações nos processos de memória, comportamento ansioso e depressivo em ratas obesas.

Tendo em vista a problemática apresentada, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se a obesidade levou a alterações nos processos de memória, comportamento ansioso e depressivo em ratas da linhagem Wistar tratadas com dieta hiperlipídica. Para isso, os animais foram tratados com dieta hipercalórica ao longo de aproximadamente 35 semanas, sendo que durante esse período foram avaliados parâmetros metabólicos, como ganho de peso corporal, tolerância à glicose e níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides, com o intuito de determinar o desenvolvimento de características associadas à Síndrome Metabólica. Após a verificação de ganho de peso corporal significativo nos animais tratados com dieta hipercalórica em relação aos animais tratados com dieta padrão, os animais de ambos os grupos foram submetidos a testes comportamentais a fim de se avaliar alterações nos processos de memória e o desenvolvimento de comportamento ansioso e/ou depressivo.

Ao final do protocolo os animais foram eutanasiados e estruturas do cérebro foram retiradas para avaliar a expressão de genes relacionados com a memória por PCR em tempo real.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

A obesidade é uma doença multifatorial que pode ser caracterizada pelo fenótipo de aumento de gordura corporal do indivíduo obeso (FRANCISCHI, 2000). Diversos estudos mostram que existe uma relação direta entre a obesidade e o desenvolvimento da Síndrome Metabólica (SM), condição que reúne três ou mais doenças crônicas não transmissíveis como por exemplo a hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão, diabetes tipo 2 em pacientes com esse quadro (VEDANA, 2003; MELO, 2011).

Segundo dados da OMS (2016), os números globais de obesidade são alarmantes: 1,9 bilhões de adultos foram classificados como acima do peso, sendo desses, 600 milhões são obesos, sendo assim, muitos trabalhos classificam a obesidade como uma pandemia. No Brasil, também encontramos esta problemática, pois de acordo com dados publicados pelo Ministério da Saúde mostram que 82 milhões de brasileiros adultos estão acima do peso (VIGITEL, 2015).

Wannmacher (2016) afirma que o fator primordial para a ocorrência da obesidade é o desequilíbrio entre o consumo de calorias e o gasto energético. No entanto, este desequilíbrio pode ocorrer por diversos fatores, como o consumo de dietas ricas em carboidratos simples, açúcares refinados, gorduras e estilo de vida sedentário crescente nas populações urbanas.

Além de ser um fator de risco importante para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas, respiratórias e cânceres, a obesidade vem sendo relacionada com o desenvolvimento de distúrbios cognitivos e comportamentais como por exemplo a ansiedade, depressão e déficits cognitivos (SCOTT et al., 2008; MORIN et al., 2017).

Molteni (2002) em seu trabalho, evidencia que dietas ricas em gorduras e açúcares podem exercer influências negativas nas funções cognitivas de indivíduos, podendo levar a uma diminuição na plasticidade neuronal e por consequência na aprendizagem. Outros estudos sugerem que o hipocampo, região cerebral responsável pela formação da memória é vulnerável à este mesmo tipo de dieta (REICHELT et al., 2014).

Neste contexto, temos a diabetes associada com a obesidade, como promotora de inflamações crônicas que podem comprometer a barreira hemato-encefálica, barreira protetora do sistema nervoso central, o que leva a alterações nos níveis de citocinas

periféricas, sendo prejudiciais para a função sináptica e conseqüentemente declínios cognitivos (ERION et al., 2014 apud. ODEGAAR et al., 2013).

A diminuição da plasticidade neuronal relacionada com as dietas ricas em gorduras saturadas e açúcares refinados está associada com a redução da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O BDNF é um membro da família de fatores de crescimento neural e está envolvido no aumento da eficiência sináptica, conectividade neural e neuroplasticidade (JORNADA, 2014 apud. POST, 2007). É altamente expresso em regiões do cérebro como hipocampo e a amígdala, que são conhecidas por regular comportamentos cognitivos e emocionais (JORNADA, 2014 apud. STRAKOWSKI, 2005). Além disso, possui função de regular o desenvolvimento e manutenção neuronal e controla a atividade de diversos neurotransmissores (JORNADA, L. K. et al., 2014 apud. COTMAN, 2005). Assim, a redução da expressão do BDNF pode estar envolvida na piora do desempenho cognitivo dos ratos obesos (MOLTENI, 2002).

Outras neurotrofinas também parecem participar do processo de alteração de cognição e memória observada nos animais obesos. As neurotrofinas são um conjunto de proteínas que possuem função de controlar diversos aspectos da manutenção, desenvolvimento e função dos neurônios no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP). Em particular, a neurotrofina-3 (NT-3) estimula a neurogênese no hipocampo (SHIMAZU et al., 2006 apud. GHOSH, 1995).

Com relação ao gene FGF-2, este é um fator neurogênico de proliferação e diferenciação de células progenitoras multipotentes. É um gene membro da família de proteínas que se ligam a heparina e sulfato de heparano e modulam a função de uma ampla gama de tipos celulares. No Sistema Nervoso Central (SNC) o FGF-2 é expresso na região do hipocampo e tem sido implicado no controle na neurogênese de adultos (KIYOTA et al., 2011).

O gene SGK-1 é conhecido por sua função de regulação neuronal, também encontrado na região do hipocampo. E em um estudo em que animais tiveram este gene inativado pelo método de transfecção, apresentaram desempenhos ruins para testes de memória espacial e reconhecimento de objetos (LANG, 2010).

### **3. METODOLOGIA**

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie, sob Processo CEUA/UPM N° 122/11/2014, em 18 de dezembro de 2014.

Foram utilizadas doze ratas da linhagem Wistarcom um mês de vida, separados em dois grupos de seis indivíduos e mantidas em gaiolas de plástico (35 x 50 x 15 cm) em sala com temperatura controlada ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e submetidos a períodos de 12h de claro/escuro. Água e comida foram disponibilizadas *ad libitum* aos animais durante todo tratamento, sendo o grupo controle tratado com dieta padrão (1) e o grupo experimental tratado com dieta hiperlipídica (40%), totalizando 7,52 Cal/g.

**Medidas bioquímicas:** O teste de tolerância à glicose foi realizado pela manhã (10h00min) em animais submetidos a jejum de 12 horas. Ao início do protocolo os animais receberam glicose (2g/Kg PC) dissolvida em solução salina (0,9% NaCl), intraperitonealmente. Os níveis glicêmicos foram avaliados por meio de glicosímetro (One touch Ultra, Johnson & Johnson, São Paulo, SP) nos tempos zero (basal), 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose (ASENSIO et al., 2005).

As medidas de colesterol e triglicérides plasmáticos foram determinadas por colorimetria utilizando-se o equipamento NanoDrop e um *kit* comercial (Enzymatic Cholesterol Human GmbH, Germany), seguindo as instruções do fabricante.

**Testes comportamentais:** Para a realização dos testes comportamentais foi necessário determinar a fase do ciclo estral das ratas para obter um grupo mais homogêneo para avaliar nos testes comportamentais (VIELA, et al., 2007). Para isso, foi realizada a avaliação do esfregaço vaginal para determinação do ciclo estral dos animais durante o desenvolvimento dos testes comportamentais, aqueles que se apresentavam nas fases de metaestro e diestro foram considerados aptos para realizar os testes comportamentais, devido aos níveis hormonais apresentados nessas fases.

O teste de campo aberto (*Open Field*) foi realizado com as ratas sempre no mesmo período do dia (tarde), e nas mesmas fases do ciclo estral (Metaestro e Diestro). Antes de iniciar a sessão, os animais foram habituados à sala de testes comportamentais por mais de uma hora, com a luz enfraquecida por uma penumbra. Cada fêmea foi colocada individualmente no centro da arena e gravada por 10 minutos. Entre um animal e outro o aparato foi limpo com álcool 5%GL para que o odor dos animais anteriores fosse completamente eliminado. Os parâmetros observados para análise no campo aberto foram: frequência de locomoção e de levantar, imobilidade, self grooming e frequência de defecação. Foi considerada a mudança de quadrante quando o animal entrava no novo quadrante com as quatro patas. O levantar foi considerado quando o animal permaneceu apoiado sobre as patas posteriores, com o troco na posição vertical, com a cabeça para cima. A imobilidade foi

considerada quando o animal ficou parado, sem realizar nenhuma atividade. Todos os parâmetros foram medidos em segundos.

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado na arena de campo aberto. O teste foi dividido em três momentos: treinamento, teste e reteste e foram utilizados quatro objetos diferentes entre si (A, B, C e D). No treinamento cada animal separadamente foi apresentado aos objetos A e B e ficaram livres para explorá-los por 10 minutos. Na fase de teste, 3 horas depois, o animal foi colocado novamente na arena e o objeto B foi substituído pelo objeto C, para explorá-los por 3 min. No reteste, 24 horas depois, o mesmo animal foi colocado novamente na arena, e o objeto C foi substituído pelo objeto D e ficou livre para explorar os objetos por 3 min. O objeto A é mantido em todas as fases. Os parâmetros analisados foram: frequência em cada objeto, tempo de exploração de cada objeto, frequência de self grooming e defecação.

**Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real:** Os animais foram submetidos ao tratamento com dieta rica em gordura e após o estabelecimento da síndrome metabólica foram sacrificados. A amígdala, o hipocampo e o córtex foram isolados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para medida dos níveis de genes regulados pelo hormônio tireoidiano e relacionados com processos de memória, aprendizagem e ansiedade através da técnica de PCR em tempo real. Inicialmente foi realizada a extração do RNA total do tecido com o auxílio da solução de TRizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (500µl) e por métodos colorimétricos, utilizando o equipamento de espectrofotometria NanoDrop 2000. Foi, então, iniciada a reação de transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA), sendo necessários cerca de 2-4µg do RNA total obtido, que foi processado por meio da utilização do kit comercial SuperScript™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR em termociclador Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Após isso, foi realizada a PCR em tempo real com o auxílio do kit comercial QuantiTect™ SYBR® Green PCR (Qiagen, Valencia CA, EUA). Ao término dessa etapa foi realizada a verificação da especificidade da geração obtida do fragmento amplificado por meio da determinação da melting curve, sendo que o cDNA obtido foi utilizado para a determinação da expressão do RNA mensageiro dos genes mencionados anteriormente, além da ciclofilina A que foi utilizada como controle interno. Por fim, os valores referentes à amplificação do RNA mensageiro de cada um dos genes analisados foram determinados por meio de métodos de fluorescência e quantificados por um termociclador e detector RotorGene 6000 (Corbert, Austrália).

**Análise dos resultados:** Para a análise dos resultados foi utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

As diferenças entre os valores médios de cada grupo foram testadas pelo teste T de student. E quando foram analisados dois fatores (tempo e tratamento), empregou-se a ANOVA de Duas Vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Em todas as análises efetuadas, as diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . Os dados estão expressos como média erro padrão.

#### 4. RESULTADO E DISCUSSÃO

A fim de determinar se o tratamento com a dieta hipercalórica de fato estabeleceu o modelo de síndrome metabólica, avaliamos diversos parâmetros classicamente envolvidos nesta síndrome, como peso corporal, tolerância à glicose e lípides plasmáticos.

**Peso corporal:** No início do tratamento, todos os animais apresentavam peso corporal semelhante, como podemos observar na Figura 1, mas ao longo do estudo pudemos visualizar uma diferenciação do peso entre o grupo experimental com relação ao grupo controle, sendo que os animais experimentais, submetidos à dieta hiperlipídica, apresentaram maior peso corporal que o grupo controle. Isto se comprova estatisticamente por meio do teste de ANOVA de Duas Vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Reforçando os dados anteriores, na segunda imagem da Figura 1, temos o delta corporal para cada um dos grupos, controle e experimental. Quando analisada pelo teste T, notamos que há diferença, com relação a um ganho de peso corporal maior do grupo experimental, quando comparados com os animais do grupo controle.

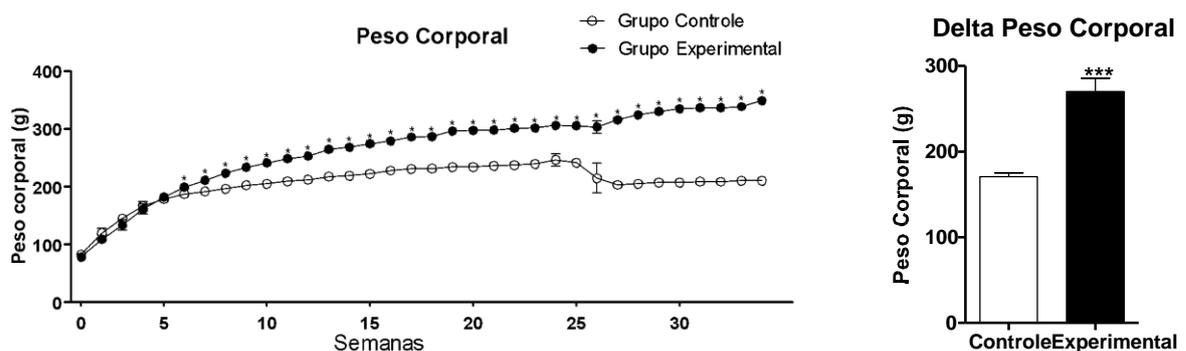


Figura 1. Determinação do peso corporal dos animais controle e experimentais, em gramas, ao longo das semanas de tratamento e determinação do ganho de peso corporal, em gramas, ao final do tratamento, em animais controle e experimentais. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão,  $N=6$  animais nos grupos controle e experimental. ANOVA de Duas Vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Foram considerados significantes os resultados em que  $*p < 0,05$ .

Foi analisado também o consumo alimentar dos grupos estudados, conforme apresentado na Figura 2, o grupo submetido a tratamento com dieta padrão consome uma quantidade de ração maior quando comparados ao grupo submetido a tratamento com dieta

hiperlipídica, sendo esta diferença relevante. Mas partindo da informação que a quantidade de calorias contida na dieta padrão é de 1,8 Cal/g e a quantidade na dieta hiperlipídica é de 7,52 Cal/g, temos um maior consumo calórico por meio dos animais do grupo experimental, o que é explícito na segunda imagem da Figura 2.

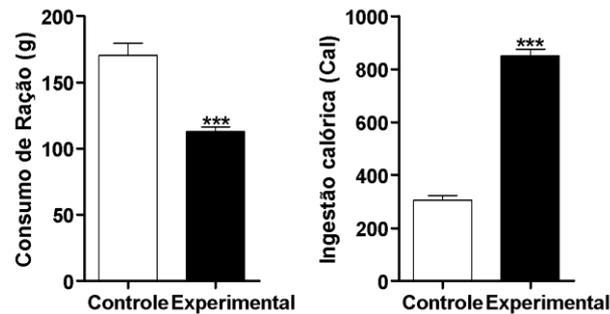


Figura 2. Determinação da média de consumo alimentar diário e média de ingestão calórica diária, em gramas, em animais do grupo controle, tratados com dieta padrão e animais experimental, tratados com dieta hiperlipídica. Os dados estão representados com média  $\pm$  erro padrão. N= 6 animais no grupo controle e experimental. Teste T. Foram considerados significantes os resultados em que  $*p < 0,05$ .

**Tolerância à glicose:** Os resultados observados para o Teste de Tolerância à Glicose (GTT) podem ser observados na Figura 3, em que os grupos controle e experimental, submetidos a diferentes dietas, apresentam glicemia de jejum similar. Com o decorrer do tempo, os animais do grupo experimental mostram uma maior dificuldade em metabolizar a glicose já após 60 minutos da injeção de glicose, e essa característica se manteve, até 120 minutos após a injeção de glicose, quando a glicemia dos grupos se igualaram. Com base nos dados referentes a curva glicêmica do GTT (Figura 3), calculou-se a área sob a curva, tornando mais expressiva a diferença dos níveis glicêmicos entre os grupos, como podemos visualizar na Figura 4. Os dados obtidos indicam que os animais submetidos a tratamento com dieta rica em gorduras levam maior tempo para metabolizar a glicose injetada.

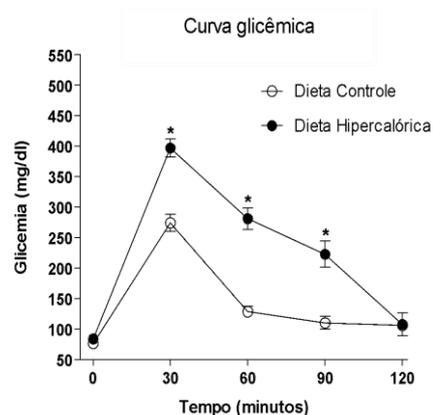


Figura 3. Variação da glicemia em mg/dL, avaliados pelo Teste de Tolerância a glicose, em animais do grupo controle, tratados com dieta padrão e animais experimental, tratados com dieta hiperlipídica. Os dados estão representados com média  $\pm$  erro padrão. N= 6 animais no grupo controle e experimental. Teste T. Foram considerados significantes os resultados em que  $*p<0,05$ .

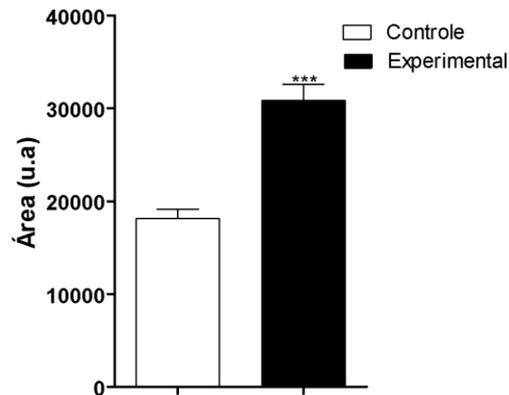


Figura 4. Determinação da área sob a curva do gráfico de GTT, de animais do grupo controle, tratados com dieta padrão e animais do grupo experimental, tratados com dieta hiperlipídica. Os dados estão representados com média  $\pm$  erro padrão. N= 6 animais no grupo controle e experimental. Teste T. Foram considerados significantes os resultados em que  $*p<0,05$ .

**Lípides plasmáticos:** Os resultados obtidos pela medida do colesterol e das triglicérides plasmáticas dos dois grupos de animais, podem ser observados na Figura 5. Houve um aumento nos níveis de triglicérides, mas não nos níveis de colesterol total.

O resultado observado referente à medida de colesterol plasmático apresentou um padrão inesperado, em que os animais do grupo controle possuem níveis de colesterol plasmáticos mais elevados que animais do grupo experimental. Este dado entra em discordância com o esperado para animais em estado de síndrome metabólica.

Um aumento nas concentrações plasmáticas de triglicérides dos animais do grupo experimental em relação ao grupo controle também foi observado, sendo este dado mais um índice de que os animais podem estar sofrendo alterações no metabolismo energético que promovam o surgimento da síndrome metabólica, tornando possível inferir que haja comprometimento hepático.

No entanto, para que possamos afirmar que, de fato, o fígado desses animais esteja comprometido, seria necessária a realização da análise histológica e dos níveis de RNA mensageiro das enzimas envolvidas no metabolismo hepático de gorduras. O estudo desses parâmetros poderá auxiliar a compreensão da discordância entre o significativo aumento de

peso nos animais submetidos à dieta hipercalórica e os baixos níveis de colesterol plasmático observado nos mesmos.

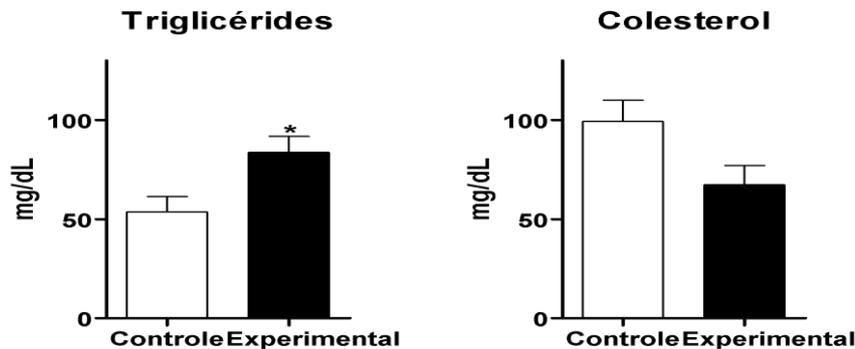


Figura 5. Determinação dos níveis do colesterol e triglicérides plasmáticos, em mg/dL, de animais do grupo controle, tratados com dieta controle e animais do grupo experimental, tratados com dieta hiperlipídica. Os dados estão representados com média  $\pm$  erro padrão. N= 6 animais no grupo controle e experimental. Teste T. Foram considerados significantes os resultados em que  $*p < 0,05$ .

**Testes Comportamentais:** Após verificar com as medidas metabólicas e com parâmetros corporais que os animais estudados apresentam padrões que classificam uma Síndrome Metabólica, as ratas foram submetidas aos testes comportamentais para avaliar se os animais obesos apresentavam alterações comportamentais.

O primeiro teste realizado foi o Campo Aberto no qual os parâmetros analisados foram de frequência de locomoção na periferia e no centro, frequência e tempo de levantar, tempo de imobilidade e self grooming (Figura 6,7,8). Esses resultados mostram que a obesidade não interferiu na capacidade de locomoção dos animais e não levou à ansiedade neste ambiente de baixa emocionalidade.

Esses dados mostram que tanto animais do grupo controle como os animais do grupo experimental não apresentam problemas de locomoção, o que pode ser evidenciado na Figura 6, com a frequência de locomoção dos animais de ambos os grupos.

Dentre todos os parâmetros analisados, apenas para o parâmetro para *self grooming*, observamos no terceiro gráfico da Figura 8, que existe significância entre os grupos, com o grupo controle apresentando valores mais expressivos.

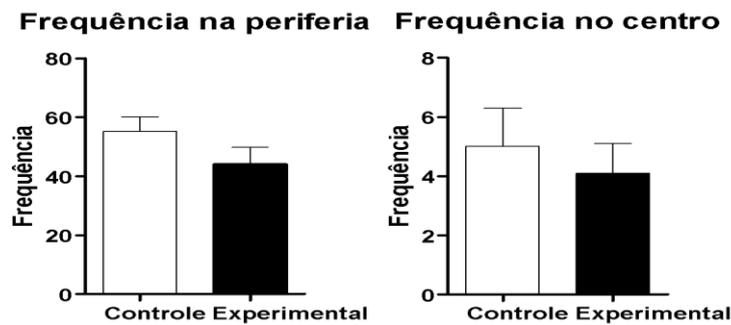


Figura 6. Frequência na periferia e no centro avaliadas em campo aberto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão, N=5 animais grupo no controle e N=6 animais no grupo experimental. Teste T. Foram considerados significantes os resultados em que  $*p < 0,05$ .

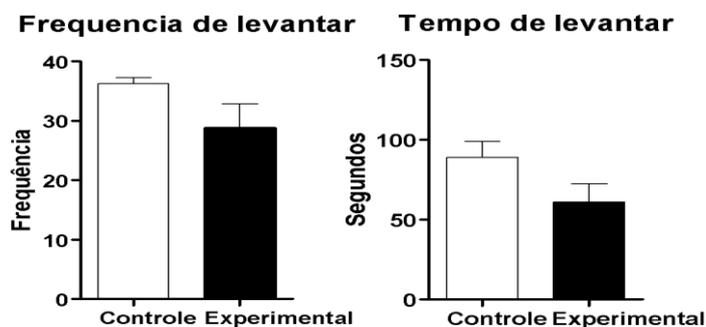


Figura 7. Frequência e tempo de levantar avaliada em campo aberto, para ratas tratadas com dieta hiperlipídica ou dieta padrão. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão, N=5 animais grupo no controle e N=6 animais no grupo experimental. Teste T. Foram considerados significantes os resultados em que  $*p < 0,05$ .

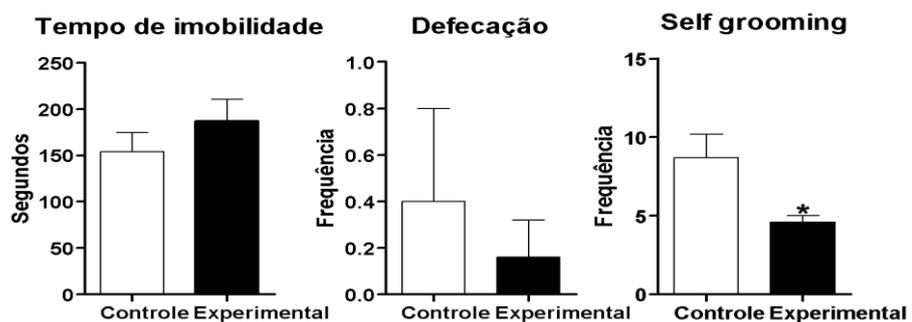


Figura 8. Tempo de imobilidade, defecação, self grooming avaliados em campo aberto, para ratas tratadas com dieta hiperlipídica ou dieta padrão. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão, N=5 animais grupo no controle e N=6 animais no grupo experimental. Teste T. Foram considerados significantes os resultados em que  $*p < 0,05$ .

A fim de avaliar se a obesidade leva a prejuízos na formação da memória declarativa, submetemos os animais ao teste de Reconhecimento de Objetos. Como podemos observar na Figura 9, os animais de ambos os grupos apresentaram tempo e frequência semelhante

quando foram colocados em contato com os dois objetos desconhecidos durante a fase de treinamento.

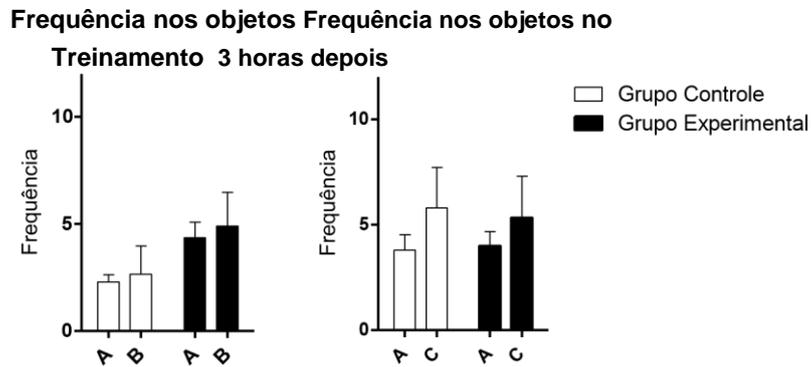


Figura 9. Frequência de reconhecimento de objetos em campo aberto, para ratas tratadas com dieta hiperlipídica ou dieta padrão. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrão, N=5 animais grupo no controle e N=6 animais no grupo experimental. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Foram considerados significantes os resultados em que  $*p < 0,05$ .

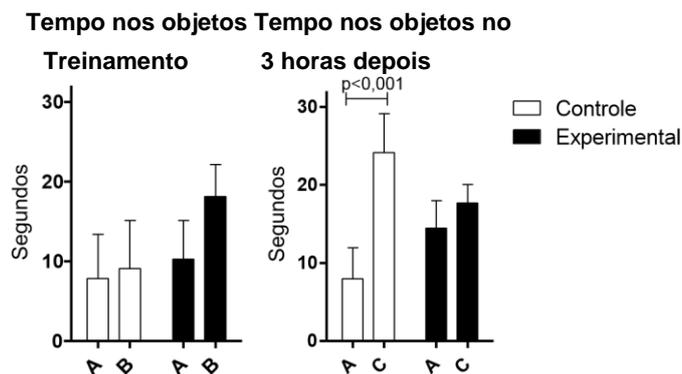


Figura 10. Tempo de reconhecimento de objetos em campo aberto, para ratas tratadas com dieta hiperlipídica ou dieta padrão. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrão, N=5 animais grupo no controle e N=6 animais no grupo experimental. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni ( $*p < 0,001$ , em relação ao grupo controle). Foram considerados significantes os resultados em que  $*p < 0,05$ .

Na segunda fase do teste realizada 3 horas depois da primeira fase, podemos observar que quando em contato com um objeto novo, os animais controles, embora não haja diferença quanto à frequência de contatos com os objetos, passaram significativamente mais tempo com o objeto novo, esses resultados podem ser observados respectivamente nos gráficos de “3 horas depois” nas Figuras 9 e 10. Quanto aos animais obesos, podemos observar que eles não foram capazes de reconhecer o novo objeto como desconhecido, passando tempo igual com ambos objetos: novo e familiar.

### Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real:

Como foi possível observar nos testes de comportamento realizados, os animais obesos apresentam um prejuízo na memória de curto prazo. Com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos na diminuição da consolidação da memória nesses animais, avaliamos a expressão de alguns genes relacionados com a formação de memória no hipocampo, região relacionada com a formação de memória.

Como podemos observar na figura 11 os animais obesos apresentaram uma diminuição na expressão dos genes SGK-1 e FGF-2, que são genes que estão relacionados com as funções neuronais e com a formação da memória.

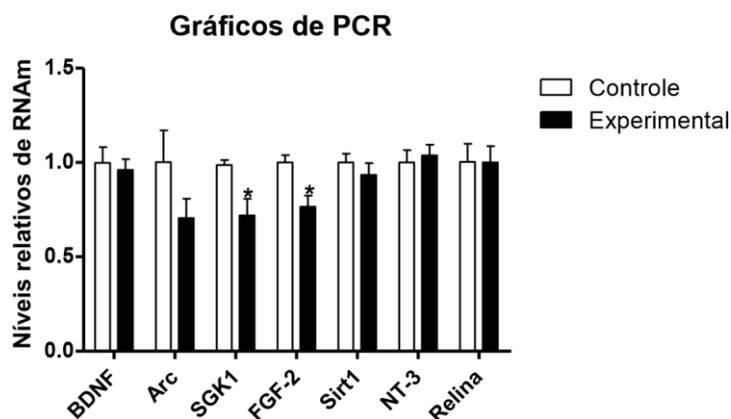


Figura 11. Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real no hipocampo das ratas tratadas com dieta hiperlipídica e dieta padrão. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrão, N=6 animais grupo no controle e N=6 animais no grupo experimental. Teste T. Foram considerados significantes os resultados em que \* $p < 0,05$ .

A diminuição da expressão do gene SGK-1 nos animais obesos encontrada nos nossos resultados corrobora com o trabalho de Lang e colaboradores (2010), que mostra que animais com diminuição dos níveis de mRNA desse gene apresentam déficits de memória e memória espacial. Dessa forma, a diminuição da expressão desse gene pode estar relacionada com a dificuldade desses animais na formação da memória.

FGF-2 apresentou seus níveis de expressão diminuídos nos animais obesos e

podemos relacionar esse dado com os estudos de Eckenstein e colaboradores (1994) que estudou a administração de FGF-2 em ratos com lesão cerebral isquêmica induzida experimentalmente. Nesse trabalho, os danos foram parcialmente revertidos com o aumento da reprodução celular no cérebro, estímulo neuronais e nos astrócitos e diferenciação dos oligodendrócitos, mostrando a relação desse gene com a formação de novos neurônios.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos neste estudo diferem dos dados publicados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa quanto a presença da avaliação das expressões gênicas por meio da PCR em tempo real, no hipocampo dos animais do grupo controle e experimental.

A partir dos dados obtidos pudemos concluir que a dieta hiperlipídica leva a alguns prejuízos, tais como aumentos do peso corporal, resposta mais lenta na metabolização da glicose e aumento nas concentrações plasmáticas de triglicérides. Os níveis de colesterol plasmáticos mais baixos nos animais obesos sugerem que esses animais podem apresentar algum comprometimento hepático, que poderia ser confirmado através de análises histológicas e dos níveis de RNA mensageiro das enzimas envolvidas no metabolismo hepático de gorduras.

Os testes comportamentais de campo aberto mostraram que os animais obesos não apresentam prejuízos na atividade locomotora, mas exploram menos o ambiente verticalmente, o que pode estar ligado a um comportamento ansioso em que o animal experimental se mostra mais recluso.

Além das alterações metabólicas a obesidade está associada com estados cognitivos e emocionais adversos. No nosso estudo mostramos que a memória de curto prazo se encontra prejudicada nas ratas obesas.

Com os resultados das PCRs pudemos avaliar alguns mecanismos pelos quais os prejuízos na memória de curto prazo se estabeleceram.

## 5. REFERÊNCIAS

- ECKENSTEIN, F. P. Fibroblast growth factors in the nervous system. **Journal of Neurobiology**. 1994. p.1467–1480.
- FRANCISCHI, R. P.P. de. PEREIRA, L. O. FREITAS, C. S. KLOPFER, M. SANTOS, R. C. VIEIRA, P. LANCHÁ JÚNIOR, A. H. Obesidade: Atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 17-28, jan/abr. 2000.
- JORNADA, L. K., VALVASSORI, S. S., RESENDE, W. R., MORETTI, M., FERREIRA, C. L., FRIES, G. R., KAPCZINSKI, F., QUEVEDO, J. Decreased BDNF levels in amygdala and hippocampus after intracerebroventricular administration of ouabain. **Revista de Psiquiatria Clínica**. 39(5). p.157-160. 2014.
- MELO, D.E. Doenças desencadeadas ou agravadas pela obesidade. 2011.

MOLTENI, R. BERNARD, R. J., YING, Z., ROBERTS, C. K., GÓMEZ-PINILLA, F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity and learning. **Neuroscience**. Vol. 112. nº 4. p. 803-804. 2002.

MORIN, J. P. DURÁN, L. F. R. RAMOS, K. G. CRUZ, C. P. FERREIRA, G. CINTRA, S. D. LÓPEZ, G. P. Palatable Hyper-Caloric Foods Impact on Neuronal Plasticity. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v. 11. 2017.

OMS. Obesidade e sobrepeso. Ficha técnica N°. 311. Última atualização Junho de 2016. Acesso em 10/04/2017.

REICHEL, A. C., MANIAM, J., WESTBROOK, R. F., MORRIS, M. J. Dietary induced obesity disrupts trace fear conditioning and decreases hippocampal reelin expression. **Elsevier**. p. 1-8. 2014.

SCOTT, K.M.; BRUFFAERTS, R.; SIMON, G.E.; ALONSO, J.; ANGERMEYER, M.; DE GIROLAMO, G.; DEMYTTENAERE, K.; GASQUET, I.; HARO, J.M.; KARAM, E.; KESSLER, R. C.; LEVINSON, D.; MORA, M. E. M. M.; BROWNE, O.; ORMEL, J. H.; VILLA, J. P.; UDA, H.; VON KORFF, M. Obesity and Mental Disorders in the General Population: Results from the World Mental Health Surveys. **National Institutes of Health**. v.32. n. 1. p.192–200, 2008.

SHIMAZU, K., ZHAO, M., SAKATA, K., AKBARIAN, S., BATES, B., JAENISCH, R., LU, B. NT-3 Facilitates Hippocampal Plasticity and Learning and Memory by Regulating Neurogenesis. **Learning and Memory**. 13. p. 307-315. 2006. Disponível em: <<http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.76006>>. Acesso em: 28 de agosto de 2014.

VIGITEL. Obesidade atinge mais da metade da população brasileira, aponta estudo. **Portal Brasil**. Última atualização em 26/08/2015. Acesso em 10/04/2017.

VILELA, M. G. JÚNIOR, J. L. dos S. SILVA J. G. de C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **FEMINA**, v. 35. n.10, p. 667-670, outubro. 2007.

WANNMACHER, L. Obesidade como fator de risco para morbidade e mortalidade: evidências sobre o manejo com medidas não medicamentosas. **OPAS/OMS**, Brasília, v. 1, n. 7, maio. 2016.

**Contatos:** panizza.julia@gmail.com e miriam.ribeiro@mackenzie.com